

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6927875号
(P6927875)

(45) 発行日 令和3年9月1日(2021.9.1)

(24) 登録日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int.Cl.	F I				
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A		
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C O 7 K	16/40			
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K	16/46			
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13			
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15			

請求項の数 15 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-514687 (P2017-514687)	(73) 特許権者	505257682
(86) (22) 出願日	平成27年9月15日 (2015.9.15)		シムフォゲン・アクティーゼルスカブ
(65) 公表番号	特表2017-534259 (P2017-534259A)		S Y M P H O G E N A / S
(43) 公表日	平成29年11月24日 (2017.11.24)		デンマーク、デーコーー2750バレラッ
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/002110		プ、ペデルストルブヴァイ93番
(87) 国際公開番号	W02016/042412	(74) 代理人	100101454
(87) 国際公開日	平成28年3月24日 (2016.3.24)		弁理士 山田 卓二
審査請求日	平成30年9月10日 (2018.9.10)	(74) 代理人	100062144
(31) 優先権主張番号	62/051,190		弁理士 青山 稜
(32) 優先日	平成26年9月16日 (2014.9.16)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗MET抗体および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一の抗MET抗体またはその抗原結合部分および第二の抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む抗体組成物であって、ここで、該第一の抗MET抗体の重鎖CDR(H-CDR)1~3および軽鎖CDR(L-CDR)1~3が、それぞれ配列番号:21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含み、そして該第二の抗MET抗体のH-CDR1~3およびL-CDR1~3が、それぞれ配列番号:27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、抗体組成物。

【請求項2】

a) 該第一の抗MET抗体の重鎖可変ドメイン(VH)および軽鎖可変ドメイン(VL)が、それぞれ配列番号:6および8のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、そして

該第二の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号:10および12のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する;

b) 該第一の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号:6および8のアミノ酸配列を含み、そして

該第二の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号:10および12のアミノ酸配列を含む;

c) 該第一の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号:14および16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有し、そして

10

20

該第二の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号：18および20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する；または、

d) 該第一の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号：14および16のアミノ酸配列を含み、そして

該第二の抗MET抗体のVHおよびVLが、それぞれ配列番号：18および20のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体組成物。

【請求項3】

該組成物が、

- a) METの分解を誘導する；
 - b) SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33およびOkajimaから選択される少なくとも1つの細胞株のインビトロでの増殖を阻害する；
 - c) METリン酸化を阻害する；
 - d) MET下流シグナル伝達を阻害する；
 - e) HGFの存在下または不存在下での初代内皮細胞増殖を阻害する；および
 - f) インビボでの腫瘍増殖を阻害する
- からなる群より選択される少なくとも1つの特性を有する、請求項1または2に記載の抗体組成物。

【請求項4】

第一の抗MET抗体またはその抗原結合部分および第二の抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む抗体組成物であって、ここで、
該第一の抗MET抗体の重鎖(HC)および軽鎖(LC)が、それぞれ配列番号：34および33のアミノ酸配列を含み、そして
該第二の抗MET抗体のHCおよびLCが、それぞれ配列番号：36および35のアミノ酸配列を含む、抗体組成物。

【請求項5】

抗MET抗体またはその抗原結合部分であって、

- a) それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含む、H-CDR1~3およびL-CDR1~3を有する；
 - b) 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)ならびに配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する；または、
 - c) 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)ならびに配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する、
- 抗MET抗体またはその抗原結合部分。

【請求項6】

抗MET抗体またはその抗原結合部分であって、

- a) それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1~3およびL-CDR1~3を有する；
 - b) 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する；または、
 - c) 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する、
- 抗MET抗体またはその抗原結合部分。

【請求項7】

抗体の重鎖(HC)が、配列番号：34のアミノ酸配列を含み、そして該抗体の軽鎖(LC)が、配列番号：33のアミノ酸配列を含む、抗MET抗体またはその抗原結合部分。

【請求項8】

抗体の重鎖(HC)が、配列番号：36のアミノ酸配列を含み、そして該抗体の軽鎖(LC)が、配列番号：35のアミノ酸配列を含む、抗MET抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 9】

請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗 M E T 抗体の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、および軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 10】

請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗 M E T 抗体の、重鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、および軽鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の宿主細胞を提供し、該宿主細胞を抗体またはその部分の発現に適する条件下で培養し、そして得られた抗体またはその部分を単離することを含む、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合部分の製造法。

10

【請求項 12】

第一の抗 M E T 抗体または抗原結合部分を発現可能な第一の宿主細胞および第二の抗 M E T 抗体または抗原結合部分を発現可能な第二の宿主細胞を提供し、該第一および第二の宿主細胞を抗体またはその部分の発現に適する条件下で培養し、そして得られた抗体または部分を単離することを含み、場合により、第一および第二の宿主細胞を単一のバイオリアクター中で培養する、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体組成物の製造法。

【請求項 13】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体組成物または請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗 M E T 抗体もしくは抗原結合部分、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

20

【請求項 14】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体組成物の第一および第二の抗 M E T 抗体または抗原結合部分の結合特異性を有する、二重特異性結合分子であって、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25 および 26 のアミノ酸配列の H - C D R 1 ~ 3 および L - C D R 1 ~ 3 を含む第一の抗原結合部分；ならびに、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31 および 32 のアミノ酸配列の H - C D R 1 ~ 3 および L - C D R 1 ~ 3 を含む第二の抗原結合部分を含む、二重特異性結合分子。

【請求項 15】

30

a) M E T 介在性障害を有するヒト患者の処置、または
b) 癌を有するヒト患者の処置における使用のための、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体組成物、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の抗 M E T 抗体もしくは抗原結合部分、請求項 13 に記載の医薬組成物、または請求項 14 に記載の二重特異性結合分子を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2014年9月16日に提出された米国仮特許出願第62/051,190 に基づく優先権の利益を主張し、その内容全体は、引用により本明細書中に包含される。

40

【0002】

配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出され、その内容全体が引用により本明細書中に包含される配列表を含む。2015年9月15日に作成された A S C I I コピーの名称は、110285-0051-W01_SL.txt であり、そのサイズは 78,490 バイトである。

【0003】

発明の分野

本発明は、抗 M E T 抗体および抗体組成物ならびに M E T と関連する疾患および病状の処置におけるそれらの使用方法に関する。

50

【背景技術】

【0004】

発明の背景

MET (c-METとしても知られる)は、50 kDaの -サブユニットおよび145 kDaの -サブユニットを含む受容体チロシンキナーゼである。METに対する既知のリガンドは、細胞分散因子としても公知の肝細胞増殖因子(HGF)のみである。METへのHGFの結合は、受容体二量体化ならびに -サブユニット残基Y1349およびY1356の自己リン酸化をもたらし、ホスホイノシトール 3 -キナーゼ(PI3K) -タンパク質キナーゼB(Akt)経路、シグナル伝達兼転写活性化因子因子(STAT)経路、マイトージェン -活性化プロテインキナーゼ(MAPK)経路、および活性化B細胞の核因子カッパ -軽鎖エンハンサー(NF B)経路を含む、下流シグナル伝達経路を活性化させる。これは、最終的に、有糸分裂促進、細胞増殖、細胞生存、および細胞運動性の増加をもたらす。HGFの過剰発現、遺伝子増幅、突然変異、または選択的スプライシング、あるいはHGFリガンド誘導性オートクリン/パラクリンループシグナル伝達を介して、METまたはHGF活性の調節不全が起こり得る。このような調節不全は、癌浸潤性、血管形成、転移および腫瘍増殖を促進することによって多くの癌において役割を果たし、より悪性の癌表現型および予後不良をもたらす。

10

【0005】

METはまた、EGFR、TGF- およびHER3のような他の受容体が関与するシグナル伝達経路と相互作用することが知られており、それらの受容体を標的とする処置に対する耐性に役割を果たし得る。従って、抗MET抗体のようなMET阻害剤は、耐性表現型を克服する上で他の受容体阻害剤と組み合わせて有効であり得る。

20

【0006】

現在のMET阻害剤には、METまたはそのリガンド、HGF、および小分子キナーゼ阻害剤のいずれかを標的とすることができる両方のモノクローナル抗体が含まれる。MET経路を標的とする公知の抗体には、ヒト化抗MET抗体オンツズマブ(OA-5D5、OAM4558g、MetMAb)；ヒト化抗HGF抗体フィクロツズマブ(AV-299)；ヒト化抗HGF抗体リルテツズマブ(AMG102)；ヒト化抗HGF抗体TAK701；ヒト化IgG4抗c-MET抗体LY2875358/LA480；ヒト化抗c-MET抗体ABT-700(H224G11)；および、ARGX-111抗c-MET抗体(36C4)が含まれる。公知の抗MET低分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤には、チバンチニブ、カボザンチニブ、フォルチニブ、ゴルバチニブおよびクリゾチニブが含まれる。しかしながら、抗MET抗体は治療的使用のために承認されていない。

30

【0007】

癌の進行におけるMETの重要な役割を考慮して、METを標的とする新規かつ改良された治療法が必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

発明の概要

本発明は、新規のMETを標的とする組換え抗体、ならびに2以上のこれらの抗体を含む組成物、および非小細胞肺癌、胃癌、肝細胞癌、食道癌、結腸直腸癌、乳頭状腎細胞癌、腎芽細胞腫、副腎皮質癌、腎細胞癌、前立腺癌、およびMETを発現もしくは過剰発現するか、またはMET経路活性化に依存する他の癌種を含む癌を治療するための抗体および組成物の使用を対象とする。抗体治療を含む、このような癌に対する現在利用可能な治療と比較して、本発明の抗体は、単独で、または2以上のかかる抗体を含む組成物のいずれかで優れた臨床応答を提供すると考えられる。

40

【0009】

一態様において、本発明は、第一の抗MET抗体またはその抗原結合部分および第二の抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む抗体組成物を提供する。

【0010】

50

ある態様において、第一の抗MET抗体は、ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合し、そして第二の抗MET抗体は、ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する。

【0011】

ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合し、そして第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する。ある態様において、第一のMET抗体は、SEMA-ブレード (blade) 3に結合することができ、第二のMET抗体は、SEMA-ブレード 2に結合することができる。これらの抗体の組み合わせは、両方のエピトープを標的とし、METシグナル伝達経路の驚くべき相乗的阻害効果を生じる。本発明者らは、これらのエピトープの組み合わせた標的化が、METシグナル伝達経路に対して驚くほど高い阻害活性を生じることを見出した。

【0012】

ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：23のアミノ酸配列を含むH-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：6または14のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：6または14のアミノ酸配列を含むVHを含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)を含む。

【0013】

ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：26のアミノ酸配列を含むL-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：8または16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：8または16のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)を含む。

【0014】

ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：23のアミノ酸配列を含むH-CDR3および配列番号：26のアミノ酸配列を含むL-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：6または14のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVHおよびそれぞれ配列番号：8または16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVLを含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、配列番号：6または14のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：8または16のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第一の抗MET

抗体は、それぞれ配列番号：14のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：34のアミノ酸配列を含むHCおよびそれぞれ配列番号：33のアミノ酸配列を含むLCを含む。

【0015】

ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：10または18のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVHを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：10または18のアミノ酸配列を含むVHを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCを含む。

10

【0016】

ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含む、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：12または20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：12または20のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：35のアミノ酸配列を含むLCを含む。

20

【0017】

ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3および配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：10または18のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVHおよび配列番号：12または20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：10または18のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：12または20のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：10のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：18のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含むVLを含む。ある態様において、第二の抗MET抗体は、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCおよび配列番号：35のアミノ酸配列を含むLCを含む。

30

【0018】

本発明はまた、本明細書に記載の第一および第二の抗MET抗体の任意の組み合わせを含む抗体組成物を提供する。

40

【0019】

例えば、ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：23および26のアミノ酸配列を含むH-CDR3およびL-CDR3を有し、そして第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：29および32のアミノ酸配列を含むH-CDR3およびL-CDR3を有する。ある態様において、第一の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有し、そして第二の抗MET抗体は、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する。

50

【 0 0 2 0 】

ある態様において、第一の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：6および8のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、第二の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：10および12のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である。ある態様において、第一の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：14および16のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、第二の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：18および20のアミノ酸配列と少なくとも90%同一である。ある態様において、第一の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：6および8のアミノ酸配列を含み、第二の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：10および12のアミノ酸配列を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：14および16のアミノ酸配列を含み、第二の抗MET抗体のVHおよびVLは、それぞれ配列番号：18および20のアミノ酸配列を含む。ある態様において、第一の抗MET抗体のHCおよびLCは、それぞれ配列番号：34および33のアミノ酸配列を含み、第二の抗MET抗体のHCおよびLCは、それぞれ配列番号：36および35のアミノ酸配列を含む。

10

【 0 0 2 1 】

本明細書に記載の抗MET抗体組成物のある態様において、第一の抗MET抗体、第二の抗MET抗体または両方は、アイソタイプIgGの抗体である。任意の態様において、第一の抗MET抗体、第二の抗MET抗体または両方は、アイソタイプサブクラスIgG1の抗体である。

20

【 0 0 2 2 】

ある態様において、本明細書に記載の組成物において少なくとも1つ、少なくとも2つ、または全ての抗MET抗体は、以下からなる群より選択される、少なくとも1つの特性、または特性の任意の組み合わせを有する：

- ・マウスまたはニワトリのMETに結合しない；
- ・SEMAドメイン上に存在する残基を含むヒトMETのエピトープに結合する；
- ・METの分解を誘発する；
- ・ 1×10^{-9} M以下の K_D でヒトMETに結合する；
- ・SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33およびOkajimaから選択される少なくとも1つの細胞株のインビトロでの増殖を阻害する；
- ・METリン酸化を阻害する；
- ・MET下流シグナル伝達を阻害する；
- ・HGFの存在下または不存在下での初代内皮細胞増殖を阻害する；および、
- ・インビボでの腫瘍増殖を阻害する。

30

【 0 0 2 3 】

ある態様において、本明細書に記載の抗MET抗体組成物のいずれかは、以下からなる群より選択される、少なくとも1つの特性、または特性の任意の組み合わせを有する：

- ・METの分解を誘発する；
- ・SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33およびOkajimaから選択される少なくとも1つの細胞株のインビトロでの増殖を阻害する；
- ・METリン酸化を阻害する；
- ・MET下流シグナル伝達を阻害する；
- ・HGFの存在下または不存在下での初代内皮細胞増殖を阻害する；および、
- ・インビボでの腫瘍増殖を阻害する。

40

【 0 0 2 4 】

本発明はまた、本明細書に記載の抗MET抗体組成物の何れかおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、抗MET抗体またはその抗原結合部分を提供する。ある態様において、該抗体またはその部分は、ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：21、22

50

、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する。ある態様において、該抗体またはその部分は、ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する。

【0026】

ある態様において、抗体またはその部分は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する。ある態様において、抗体またはその部分は、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する。

10

【0027】

ある態様において、抗体は、配列番号：23のアミノ酸配列を含むH-CDR3および/または配列番号：26のアミノ酸配列を含むL-CDR3；それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3ならびに/またはそれぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3；配列番号：6もしくは14のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVHおよび/または配列番号：8もしくは16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVL；または、配列番号：6もしくは14のアミノ酸配列を含むVHおよび/または配列番号：8もしくは16のアミノ酸配列を含むVLを含む。任意の態様において、抗体は、配列番号：6のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含むVLを含む。任意の態様において、抗体は、配列番号：14のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含むVLを含む。任意の態様において、抗体は、配列番号：34のアミノ酸配列を含むHCおよび配列番号：33のアミノ酸配列を含むLCを含む。

20

【0028】

ある態様において、抗体は、配列番号：23のアミノ酸配列を含むH-CDR3；それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3；配列番号：6または14のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVH；配列番号：6または14のアミノ酸配列を含むVH；または、配列番号：34のアミノ酸配列を含むHC、を含む重鎖を含み、配列番号：26のアミノ酸配列を含むL-CDR3；それぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3；配列番号：8または16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVL；配列番号：8または16のアミノ酸配列を含むVL；または、配列番号：33のアミノ酸配列を含むLC、を含む軽鎖をさらに含む。

30

【0029】

ある態様において、抗体は、配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3および/または配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3；それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3ならびに/またはそれぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3；配列番号：10または18のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVH、および/または、配列番号：12または20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVL；または、配列番号：10または18のアミノ酸配列を含むVHおよび/または配列番号：12または20のアミノ酸配列を含むVL、を含む。任意の態様において、抗体は、配列番号：10のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含むVLを含む。任意の態様にお

40

50

いて、抗体は、配列番号：18のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含むVLを含む。任意の態様において、抗体は、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCおよび配列番号：35のアミノ酸配列を含むLCを含む。

【0030】

ある態様において、は、抗体は、配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3；それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3；配列番号：10または18のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVH；配列番号：10または18のアミノ酸配列を含むVH；または、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHC、を含む重鎖を含み；そして、配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3；それぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含む、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3；配列番号：12または20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有するVL；配列番号：12または20のアミノ酸配列を含むVL；または、配列番号：35のアミノ酸配列を含むLC、を含む軽鎖をさらに含む。

10

【0031】

ある態様において、抗体は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する。

【0032】

ある態様において、抗体は、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する。

20

【0033】

ある態様において、抗体は、配列番号：6または14のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：8または16のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

【0034】

ある態様において、抗体は、配列番号：10または18のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：12または20のアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

30

【0035】

ある態様において、抗体は、配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

【0036】

ある態様において、抗体は、配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

【0037】

ある態様において、抗体は、配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

40

【0038】

ある態様において、抗体は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を有する。

【0039】

ある態様において、抗体は、配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)を有する。

【0040】

ある態様において、抗体は、配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖(HC)および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖(LC)を有する。

【0041】

50

本発明はまた、本明細書に記載のキメラ抗体および抗原結合部分、特に、それぞれ配列番号：6および8または配列番号：10および12に関連する重鎖および軽鎖アミノ酸配列を有する抗体および抗原結合部分、のヒト化バージョンを提供する。

【0042】

本明細書に記載の抗体および抗原結合部分のある態様において、抗体は、アイソタイプ I g Gのものであり得る。任意の態様において、抗体は、アイソタイプサブクラス I g G 1のものである。

【0043】

ある態様において、抗体は、以下からなる群より選択される、少なくとも1つの特性、または特性の任意の組み合わせを有する：

- ・マウスまたはニワトリの M E T に結合しない；
- ・ S E M A ドメイン上に存在する残基を含むヒト M E T のエピトープに結合する；
- ・ M E T の分解を誘発する；
- ・ 1×10^{-9} M 以下の K_D でヒト M E T に結合する；
- ・ S N U 5、E B C 1、M K N 4 5、K a t o I I、O E 3 3 および O k a j i m a から選択される少なくとも1つの細胞株のインビトロでの増殖を阻害する；
- ・ M E T リン酸化を阻害する；
- ・ M E T 下流シグナル伝達を阻害する；
- ・ H G F の存在下または不存在下での初代内皮細胞増殖を阻害する；および、
- ・ インビボでの腫瘍増殖を阻害する。

【0044】

本発明はまた、本明細書に記載の抗 M E T 抗体または抗原結合部分の何れかおよび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0045】

本発明は、本明細書に記載の抗 M E T 抗体の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、またはその両方を含む、単離された核酸分子を提供する。ある態様において、単離された核酸分子は、配列番号：5、7、9、11、13、15、17または19からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0046】

本発明はまた、単離された核酸分子を含むベクターを提供し、ここで、該ベクターは、発現制御配列をさらに含む。

【0047】

本発明はまた、本明細書に記載の抗 M E T 抗体の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、またはその両方を含む、宿主細胞を提供する。ある態様において、宿主細胞は、配列番号：5、7、9、11、13、15、17または19からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0048】

本発明はまた、本明細書に記載の抗 M E T 抗体の、重鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、軽鎖もしくはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、またはその両方を含む、非ヒトトランスジェニック動物または植物を提供し、ここで、該動物または植物は、そのヌクレオチド配列（複数可）を発現する。ある態様において、動物または植物は、配列番号：5、7、9、11、13、15、17または19からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0049】

本発明はまた、上記の宿主細胞を提供し、該宿主細胞を該抗体またはその部分の発現に適した条件下で培養し、そして得られた抗体またはその部分を単離することを含む、本明細書に記載の抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分の製造法を提供する。

【0050】

10

20

30

40

50

本発明はまた、本明細書に記載の第一の抗M E T抗体または抗原結合部分を発現することができる第一の宿主細胞ならびに本明細書に記載の第二の抗M E T抗体または抗原結合部分を発現することができる第二の宿主細胞を提供し、該第一および第二の宿主細胞を該抗体またはその部分の発現に適した条件下で培養し、そして得られた抗体またはその部分を単離することを含む、本明細書に記載の抗M E T抗体組成物の製造法を提供する。任意の態様において、第一および第二の宿主細胞を、単一のバイオリアクターで培養する。他の態様において、第一および第二の宿主細胞を、別個のバイオリアクターで培養する。

【0051】

本発明はまた、抗M E T抗体組成物を発現することができるポリクローナル細胞株を提供し、ここで、該ポリクローナル細胞株には、本明細書に記載の第一の抗M E T抗体またはその抗原結合部分を発現することができる第一の宿主細胞および本明細書に記載の第二の抗M E T抗体またはその抗原結合部分を発現することができる第二の宿主細胞が含まれる。

10

【0052】

本発明はまた、本明細書に記載の抗M E T抗体組成物の第一および第二の抗M E T抗体またはその抗原結合部分の結合特異性を有する二重特異性結合分子を提供する。任意の態様において、二重特異性結合分子は、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2およびL - C D R 3を有する抗体の抗原結合部分；ならびに、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2およびL - C D R 3を有する抗体の抗原結合部分、を含む。

20

【0053】

本発明はまた、本明細書に記載の抗M E T抗体組成物または該抗M E T抗体組成物を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、M E T介在性障害を有する該患者を治療するための方法を提供する。

【0054】

本発明はまた、本明細書に記載の抗M E T抗体もしくは抗原結合部分または該抗M E T抗体もしくは抗原結合部分を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、M E T介在性障害を有する該患者を治療するための方法を提供する。

30

【0055】

本発明はまた、本明細書に記載の抗M E T抗体組成物または該抗M E T抗体組成物を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、癌を有する該患者を治療するための方法を提供する。ある態様において、癌は、M E T活性化に依存する。任意の態様において、癌は、非小細胞肺癌、胃癌、肝細胞癌、食道癌、結腸直腸癌、乳頭状腎細胞癌、膠芽細胞腫、腎細胞癌、前立腺癌または副腎皮質癌である。

【0056】

本発明はまた、本明細書に記載の抗M E T抗体もしくは抗原結合部分または該抗M E T抗体もしくは抗原結合部分を含む医薬組成物を患者に投与することを含む、癌を有する該患者を治療するための方法を提供する。さらに、本発明は、癌を治療するための医薬の製造における、本明細書に記載の抗M E T抗体もしくは抗原結合部分または該抗M E T抗体もしくは抗原結合部分を含む医薬組成物の使用を提供する。さらにまた、本発明は、癌を治療する際に使用するための、本明細書に記載の抗M E T抗体もしくは抗原結合部分または該抗M E T抗体もしくは抗原結合部分を含む医薬組成物を提供する。ある態様において、癌はM E T活性化に依存する。任意の態様において、癌は、非小細胞肺癌、胃癌、肝細胞癌、食道癌、結腸直腸癌、乳頭状腎細胞癌、膠芽細胞腫、腎細胞癌、前立腺癌または副腎皮質癌である。任意の態様において、治療はまた、化学療法剤、抗新生物剤、抗血管新生剤、チロシンキナーゼ阻害剤、または別のM E T経路阻害剤の投与を含む。

40

【0057】

本明細書に記載の治療法のある態様において、患者は哺乳動物である。任意の態様にお

50

いて、患者は霊長動物である。特定の態様において、患者はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】図1は、互いに試験した13種のMET抗体についての競合マトリックスを示す。少なくとも50%の阻害を、エピトープビン(epitope bin)(グレーの四角形)を区別するために用いた。点線の四角形：一方向的(Unidirectional)な競合。黒で囲った四角形：同一の抗体との競合。

【0059】

【図2】図2は、HEK293細胞上に発現された、異なるヒト、マウス、ニワトリおよびキメラMET構築物に対するMET抗体の結合のまとめを示す。アミノ酸配列番号(AA)は、ニワトリまたはマウスのいずれかに置換されたヒトのMET配列を意味する。異なる構築物の概略図が示されている。個々のドメインまたはサブドメインが示されている。SP：シグナルペプチド。SV5-GPI：SV5ペプチド配列、次いでグリシン-セリンリンカーおよびGPIアンカー。変異の位置の図はおおよそであることが特記される。白色の四角形：ヒトMET配列。灰色の四角形：ニワトリ配列。斜線の四角形：マウス配列。トランスフェクト細胞への正の結合を+として示す。(+)弱く結合。- 結合しない。

【0060】

【図3】図3は、24時間または48時間の間、陰性対照抗体、9006、9338または9006+9338で処理した細胞株における、MET受容体レベルのウェスタンブロット分析の結果を示す。

【0061】

【図4】図4は、24時間の間、陰性対照抗体、9006+9338、またはC8-H241抗体のいずれかで処理した細胞株における、METレベルのシンプルウエスタン分析の結果を示す。

【0062】

【図5】図5A-5Bは、キメラ抗体9006もしくは9338または抗体混合物9006+9338で処理された細胞株における、METのリン酸化レベルのシンプルウエスタン分析を示す。

【0063】

【図6】図6A-6Bは、キメラ抗体9006もしくは9338または抗体混合物9006+9338で処理された細胞株における、ERK2およびAKTリン酸化レベルのシンプルウエスタン分析を示す。

【0064】

【図7】図7Aは、キメラ抗体9006もしくは9338、抗体混合物9006+9338、または対照抗体で処理した後の、HUVECの数を示す。合計25μg/mlの抗体を用いる(両者の単独で、および抗体混合物において)。図7Bは、404時間のインキュベーションの最終時点でのアッセイ結果を示す。データは、未処理細胞(100%)に対して正規化されている。

【0065】

【図8】図8Aは、20ng/mlのHGFの存在下で、キメラ抗体9006もしくは9338、抗体混合物9006+9338、または対照抗体で処理した後の、HUVECの数を示す。合計25μg/mlの抗体を用いる(両者の単独で、および抗体混合物において)。図8Bは、404時間のインキュベーション/HGF刺激の最終時点でのアッセイ結果を示す。データは、未処理細胞(100%)に対して正規化されている。

【0066】

【図9】図9A-9Bは、種々の量のキメラ抗体9338および9006(それぞれ、AおよびB)で処理した後の、HUVECの数の滴定曲線を示す。

【0067】

【図10】図10は、種々の量の抗体混合物9006+9338で処理した後の、HUV

10

20

30

40

50

ECの数の滴定曲線を示す。

【0068】

【図11】図11は、図9および10からの最終時点での結果を示す。データは、未処理細胞に対して正規化されている。

【0069】

【図12】図12A - 12Cは、細胞株HCC827R1__cet#3(12A)、HCC827R1__cet#1(12B)およびMKN45(12C)に対する、キメラ(左パネル)またはヒト化(右パネル)9006、9338、または9006+9338の抗増殖効果を示す代謝活性アッセイの結果を示す。

【0070】

【図13】図13A - 13Cは、細胞株EBC-1(13A)、KatoII(13B)およびOkajima(13C)に対する、キメラ(左パネル)またはヒト化(右パネル)9006、9338、または9006+9338の抗増殖効果を示す代謝活性アッセイの結果を示す。

【0071】

【図14】図14は、細胞株EBC1、MKN45、SNU5およびKatoIIに対する、Hu9338+Hu9006、13-MET、28-METおよび13-MET+28-MET抗体の滴定による生存率を示す。

【0072】

【図15】図15は、マウスにおけるヒト非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片の腫瘍増殖に対するキメラ9006、9338、9006+9338、またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0073】

【図16】図16は、マウスにおけるヒト非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片の腫瘍増殖に対するピークル処理と比較して、4つの異なる濃度でのキメラ9006+9338での処置の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0074】

【図17】図17は、マウスにおけるヒト胃癌細胞株MKN-45の異種移植片の腫瘍増殖に対するキメラ9006、9338、9006+9338、またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0075】

【図18】図18は、マウスにおけるヒト胃癌細胞株SNU5の異種移植片の腫瘍増殖に対するキメラ9006、9338、9006+9338、またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0076】

【図19】図19は、マウスにおけるヒトHCC患者由来の異種移植片モデルLI1037の異種移植片の腫瘍増殖に対するキメラ抗体混合物9006+9338またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0077】

【図20】図20は、ヒト非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片の腫瘍増殖に対する9006+9338、Hu9006+Hu9338、またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0078】

【図21】図21は、ヒトの食道胃癌細胞株OE33の異種移植片の腫瘍増殖に対する、キメラ9006+9338、ヒト化9006+9338(Hu9006+Hu9338)、またはピークル処理の効果を示す。灰色の領域は、処理期間を示す。

【0079】

【図22】図22は、ヒト非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片の腫瘍増殖に対するC8-H241、Hu9006+Hu9338またはピークル処理の効果を示す(1群あたりn=10匹のマウス)。灰色の領域は、処理期間を示す。点線は、C8-H241

10

20

30

40

50

処理群の残りのマウス (n = 4) の H u 9 0 0 6 + H u 9 3 3 8 での再処理の開始を示す。

【 0 0 8 0 】

【 図 2 3 】 図 2 3 は、ヒト胃癌細胞株 H s 7 4 6 T の異種移植片の腫瘍増殖に対する C 8 - H 2 4 1、H u 9 0 0 6、H u 9 3 3 8、H u 9 0 0 6 + H u 9 3 3 8、またはピークル処理の効果を示す (1 群あたり n = 8 匹のマウス)。灰色の領域は、最初の処理期間を示す。点線は、C 8 - H 2 4 1、H u 9 0 0 6 および H u 9 3 3 8 群の残りのマウスの、H u 9 0 0 6 + H u 9 3 3 8 での単回投与再処理を示す。

【 0 0 8 1 】

【 図 2 4 】 図 2 4 は、4 種の患者由来の異種移植片モデルにおける腫瘍増殖に対する C 8 - H 2 4 1、H u 9 0 0 6 + H u 9 3 3 8 またはピークル処理の効果を示す (L U 0 8 5 8、L 1 9 0 1 および L U 2 5 0 3 について、1 群当たり n = 5 匹のマウス；L X F A 0 5 2 6 について、1 群当たり n = 8 匹のマウス)。灰色の領域は、処理期間を示す。

10

【 0 0 8 2 】

【 図 2 5 】 図 2 5 は、ヒト非小細胞肺癌細胞株 E B C - 1 の異種移植片の腫瘍増殖に対する等しい比もしくはスキュー比 (skewed ratio) の H u 9 0 0 6 + H u 9 3 3 8 またはピークル処理の効果を示す (1 群あたり n = 8 匹のマウス)。灰色の領域は、処理期間を示す。

【 0 0 8 3 】

【 図 2 6 】 図 2 6 は、キメラ 9 0 0 6 抗体の、重鎖および軽鎖可変ドメインヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す (配列番号：5 - 8)。C D R (配列番号：2 1 - 2 6) を矢印で示している。

20

【 0 0 8 4 】

【 図 2 7 】 図 2 7 は、キメラ 9 3 3 8 抗体の、重鎖および軽鎖可変ドメインヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す (配列番号：9 - 1 2)。C D R (配列番号：2 7 - 3 2) を矢印で示している。

【 0 0 8 5 】

【 図 2 8 】 図 2 8 は、ヒト化 9 0 0 6 抗体の、重鎖および軽鎖可変ドメインヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す (配列番号：1 3 - 1 6)。C D R (配列番号：2 1 - 2 6) を矢印で示している。

30

【 0 0 8 6 】

【 図 2 9 】 図 2 9 は、ヒト化 9 3 3 8 抗体の、重鎖および軽鎖可変ドメインヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す (配列番号：1 7 - 2 0)。C D R (配列番号：2 7 - 3 2) を矢印で示している。

【 0 0 8 7 】

【 図 3 0 】 図 3 0 は、ヒト化抗体 9 0 0 6 の完全長軽鎖および重鎖アミノ酸配列 (それぞれ配列番号：3 3 および 3 4) ならびにヒト化抗体 9 3 3 8 の完全長軽鎖および重鎖アミノ酸配列 (それぞれ配列番号：3 5 および 3 6) を示す。C D R を矢印で示している。

【 0 0 8 8 】

【 図 3 1 】 図 3 1 は、M E T の構造を示す。

40

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 8 9 】

発明の詳細な説明

定義および一般的技術

本明細書において他に定義しない限り、本発明に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。本明細書に記載のものと同様または同等の方法および材料を本発明の実施または試験においても使用することができるが、例示的な方法および材料は、以下に記載される。本明細書で言及するすべての刊行物および他の文献は、その全体を引用により本明細書中に包含させる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先されるものとする。多数の文献が、本明細書に引用さ

50

れているが、この引用は、これらの文献のいずれかが当該技術分野における共通の一般知識の一部を形成するという承認を構成するものではない。

【0090】

また、文脈によって他に必要とされない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むもの。一般的に、本明細書に記載されている、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、分析化学、合成有機化学、医薬品および医薬品化学、ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリダイゼーションに関連して用いられる命名法、およびそれらの技術は、よく知られており、当該技術分野で一般に使用されている。当該技術分野において一般的に達成されるよう、または本明細書に記載されるように、酵素反応および精製操作は、製造業者の仕様書に従って行われる。

10

【0091】

本明細書および態様の全体を通して、用語「有する(have)」および「含む(comprise)」、または変形「有する(has)」、「有する(having)」、「含む(comprises)」または「含む(comprising)」は、記載された整数または整数の群の包含を意味すると理解されるが、他の整数または整数の群を除外するものではない。

【0092】

抗体関連の定義

特記しない限り、本明細書で用いる、「MET」は、ヒトMET(ヒトc-METとしても知られる)を意味する。ヒトMETポリペプチド配列は、NCBI受託番号NM_000245.2により入手可能であり、配列番号:1として示されている。ヒトMETは、19個のアミノ酸がIPTドメイン3(755-755:SSTWWKEPLNIVSFLFCFAS(配列番号:2))に挿入されている異なるアイソフォーム(アイソフォーム2;配列番号:2)にも存在する。

20

【0093】

本明細書で用いる用語“抗体”(Ab)または“免疫グロブリン”(Ig)は、ジスルフィド結合によって互い結合されている、2つの重鎖(H)(約50-70kDa)および2つの軽鎖(L)(約25kDa)を含む四量体のことを意味する。各重鎖は、重鎖可変ドメイン(VH)および重鎖定常領域(CH)からなる。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン(VL)および軽鎖定常領域(CL)からなる。VHおよびVLドメインは、“フレームワーク領域”(FR)と呼ばれる、より保存された領域に存在する(interspersed)“相補性決定領域”(CDR)と呼ばれる超可変領域にさらに細分化することができる。VHおよびVLはそれぞれ、3つのCDR(重鎖のCDRを本明細書中H-CDRと記載する;軽鎖のCDRを本明細書中L-CDRと記載する)および4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシル末端に以下の順で配置されている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各領域へのアミノ酸の割り当ては、IMGT(登録商標)の定義(Lefranc et al., Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003));または、Kabataの定義、免疫学的関心のあるタンパク質の配列(National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)および1991)); Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987);または Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)にしたがって行われ得る。

30

40

【0094】

用語“組換え抗体”とは、抗体をコードするヌクレオチド配列(複数可)を含む細胞または細胞株から発現される抗体を意味し、ここで、該ヌクレオチド配列(複数可)は、天然にはその細胞に関連していないものである。

【0095】

用語“抗体組成物”は、2つ以上の抗体またはその抗原結合部分の組み合わせを意味する。抗体組成物は、モノクローナル(すなわち、同一の抗体またはその抗原結合部分の分子からなる)またはポリクローナル(すなわち、同じ抗原上の、または別個の異なる抗原上の、同じかまたは異なるエピトープと反応する2以上の抗体または抗原結合部分からなる)であり得る。

50

【0096】

用語“単離されたタンパク質”、“単離されたポリペプチド”または“単離された抗体”は、その起源のまたは派生源の性質によって、(1)その天然の状態ですれに付随する天然で関連する構成要素に関連付けられていない、(2)同じ種由来の他のタンパク質を含まない、(3)異なる種由来の細胞によって発現される、または(4)天然には存在しない、タンパク質、ポリペプチドまたは抗体を意味する。従って、化学的に合成されたか、またはそれが自然に由来する細胞とは異なる細胞系で合成されたポリペプチドは、その天然で関連する構成成分から“単離”されている。タンパク質はまた、当該分野で周知のタンパク質精製技術を用いる単離によって、天然に関連する構成成分を実質的に含まなくなり得る。

10

【0097】

本明細書で用いる用語“生殖系列”は、それらが生殖細胞を経由して親から子孫に渡されるような、抗体遺伝子および遺伝子セグメントのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を意味する。生殖系列配列は、B細胞成熟の過程において組換えおよび超変異(hyper-mutation events)によって改変されている成熟B細胞における抗体をコードするヌクレオチド配列と区別される。特定の生殖系列配列を利用する抗体は、生殖系列ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列と整列するヌクレオチド配列またはアミノ酸配列を有し、それは他の何れかの生殖系列ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列とより近接することが特定される。

【0098】

用語“親和性”は、抗原と抗体との間の引力の尺度を意味する。抗原に対する抗体の因性の誘引性は、典型的には、特定の抗体-抗原相互作用の結合親和性平衡定数(K_D)として表される。抗体は、 K_D が1mM、好ましくは100nMのとき、抗原に特異的に結合すると言われる。 K_D 結合親和性定数は、表面プラズモン共鳴(BIACore(商標))または例えばOctet(商標)システムを用いるバイオレイヤー干渉法により、測定することができる。

20

【0099】

用語“ k_{off} ”は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を意味する。 k_{off} 解離速度定数は、例えばOctet(商標)システムを用いてバイオレイヤー干渉法により、または表面プラズモン共鳴(BIACore(商標))により、測定することができる。

30

【0100】

本明細書で用いる用語“エピトープ”は、抗体または二重特異性結合分子などの関連分子に特異的に結合する抗原の部分(決定因子)を意味する。エピトープ決定基は、一般に、アミノ酸または炭水化物または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、一般に、特定の三次元構造特性ならびに特異的な電荷特性を有する。エピトープは“直線状”または“立体的”であってよい。直線状エピトープでは、タンパク質(例えば、抗原)と相互作用分子(抗体など)との間の相互作用の点の全てが、主にタンパク質のアミノ酸配列に沿って直線的に生じ得る。立体的エピトープでは、相互作用点は、アミノ酸の一次配列において互いに分離されたタンパク質上のアミノ酸残基に沿って生じる。抗原上の所望のエピトープが決定されると、当該技術分野で周知の技術を用いて、そのエピトープに対する抗体を作製することが可能となる。さらに、抗体の作製および特徴付けは、望ましいエピトープに関する情報を解明し得る。この情報から、抗原への結合を競合する抗体を見出すために競合試験を行うことにより、同じかまたは類似のエピトープへの結合について抗体を競合的にスクリーニングすることが可能となる。

40

【0101】

当業者は、当該分野で公知の方法を用いて、抗体が同じエピトープに結合するかどうか、または抗MET抗体との結合について競合するかどうかを決定することができる。一態様において、当業者は、本発明の抗MET抗体を飽和条件下でMETに結合させて、試験抗体のMETに結合する能力を測定することができる。試験抗体が対照抗MET抗体と同時にMETに結合することができる場合、該試験抗体は、対照抗MET抗体とは異なる工

50

ピトープに結合する。しかしながら、試験抗体が同時にM E Tに結合することができない場合は、該試験抗体は、本発明の抗M E T抗体が結合するエピトープと同じエピトープ、重複するエピトープ、またはそれに近接するエピトープに結合する。この試験は、E L I S A、R I A、B I A C O R E (商標)、バイオレイヤー干渉法またはフローサイトメトリーを用いて行うことができる。抗M E T抗体が別の抗M E T抗体と交差競合するかどうかを試験するために、二方向での、すなわち、既知の抗体が試験抗体を阻害するかどうか、および試験抗体が既知の抗体を阻害するかどうかを決定する、上記の競合法を使用することができる。好ましい態様において、試験はO c t e t (商標)を使用して実施される。

【0102】

用語“キメラ抗体”は、その最も広い意味で、1つの抗体からの1またはそれ以上の領域と1またはそれ以上の他の抗体からの1またはそれ以上の領域を含む抗体を意味し、一般的に、部分的にヒト起源であり、かつ部分的に非ヒト起源である、すなわち一部が非ヒト動物、例えばマウス、ラットもしくは他のげっ歯動物、またはニワトリなどの鳥類に由来する抗体である。キメラ抗体は、ヒトの抗抗体応答、例えばマウス抗体の場合にはヒトの抗マウス抗体応答の危険性を低減するために、非ヒト抗体よりも好ましい。一般的なキメラ抗体の例は、可変領域配列がマウスであり、一方、定常領域配列がヒトである抗体である。キメラ抗体の場合、非ヒト部分は、抗体をヒト化するためにさらなる変化に供され得る。本明細書に記載のキメラ抗体は、マウス可変ドメイン配列およびヒト定常ドメイン配列を有する。

【0103】

用語“ヒト化”は、抗体が完全にまたは部分的に非ヒト起源であるという事実、例えば対象とする抗原でのマウスの免疫化から得られたマウス抗体またはかかるマウス抗体に基づくキメラ抗体を意味し、ヒトにおける免疫応答を回避するか、または最小限に抑えるために特定のアミノ酸、特にフレームワーク領域ならびに重鎖および軽鎖の定常ドメインのアミノ酸を置換することが可能である。抗体と標的抗原との相互作用の特異性は、主に、重鎖および軽鎖の6つのC D Rに位置するアミノ酸残基に存在する。従って、C D R内のアミノ酸は、C D Rの外側の配列よりも個々の抗体間でより可変である。C D R配列はほとんどの抗体-抗原相互作用に参与しているため、例えば、異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植された特定の抗体由来のC D R配列を発現する発現ベクターを構築することにより、特定の天然に存在する抗体の性質を模倣する組換え抗体、またはより一般的には所定のアミノ酸配列を有する特定の抗体を発現することが可能である。結果として、非ヒト抗体を“ヒト化”し、かつ元の抗体の結合特異性および親和性を実質的に維持することが可能である。免疫原性を正確に予測し、それによって特定の抗体のヒト抗抗体応答を予測することは不可能であるが、非ヒト抗体はヒト抗体よりも免疫原性が高い傾向がある。異種(通常はげっ歯動物)定常領域がヒト起源の配列で置換されたキメラ抗体は、一般に完全な異種起源の抗体よりも免疫原性が低く、治療用抗体はヒト化または完全ヒト抗体を目指す傾向にある。キメラ抗体または非ヒト起源の他の抗体に関しては、それゆえ、ヒトの抗抗体応答の危険性を低減するためにヒト化され得る。

【0104】

キメラ抗体に関して、ヒト化は、一般的に、可変領域配列のフレームワーク領域の修飾を含む。相補性決定領域(C D R)の一部であるアミノ酸残基は、ほとんどの場合ヒト化に関連して変化させないが、一部の場合には、例えばグリコシル化部位、脱アミド化部位、アスパラギン酸異性化部位または望ましくないシステインもしくはメチオニン残基を除去するために、個々のC D Rアミノ酸残基を変化させることが望ましいと考えられる。N結合グリコシル化は、トリペプチド配列A s n - X - S e rまたはA s n - X - T h r(ここでは、XはP r oを除く任意のアミノ酸であり得る)中のアスパラギン残基へのオリゴ糖鎖の連結によって起こる。N-グリコシル化部位の除去は、好ましくは保存的置換によって、A s nまたはS e r / T h r残基のいずれかを異なる残基に変異させることによって達成され得る。アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミド化は、p Hおよび表面露出などの因子によって起こり得る。アスパラギン残基は、主として配列A s n - G l y

10

20

30

40

50

中に存在する場合、およびより低い度合いで $A s n - A l a$ などの他のジペプチド配列中に存在する場合、特に脱アミド化を受けやすい。そのような脱アミド化部位、特に $A s n - G l y$ が $C D R$ 配列中に存在するときは、それゆえ、一般的には関与する残基の1つを除去する保存的置換によって、その部位を除去することが望ましい。

【0105】

抗体配列のヒト化のための多数の方法が当技術分野で公知である；例えば Almagro & Fransson, *Front Biosci.* 13: 1619-1633 (2008) による総説を参照のこと。1つの一般的に使用される方法は $C D R$ 移植であり、この方法は、例えばマウス由来のキメラ抗体に関しては、マウス可変領域遺伝子に対するヒト生殖細胞遺伝子対応物の同定およびこのフレームワークへのマウス $C D R$ 配列の移植を含む。 $C D R$ 移植は $K a b a t$ の $C D R$ 定義に基づき得るが、最近の公表文献 (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) は、 $I M G T$ (登録商標) の定義 (the international Immunogenetics information system (登録商標)、www.imgt.org) がヒト化の結果を改善し得ることを示唆した (Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.* 27:55-77 (2003) を参照のこと)。ある場合に、 $C D R$ 移植は、その $C D R$ が由来する親抗体と比較して、 $C D R$ 移植した非ヒト抗体の結合特異性および親和性を低下させ、したがって生物学的活性を低下させ得る。復帰突然変異 (“フレームワークリペア”とも言う) は、親抗体の結合特異性および親和性を再構築するために、 $C D R$ 移植した抗体の選択位置、一般的にはフレームワーク領域内に導入され得る。可能な復帰突然変異のための位置の同定は、文献および抗体データベースにおいて入手可能な情報を用いて実施可能である。復帰突然変異の候補であるアミノ酸残基は、一般的には抗体分子の表面に位置するものであるが、埋もれた残基または表面露出の度合いが低い残基は、通常変化させない。 $C D R$ 移植と復帰突然変異に代わる代替的ヒト化技術は、非ヒト起源の非表面露出残基を保持し、表面残基をヒト残基に変化させる、表面再構成である。

【0106】

特定の場合には、標的エピトープに対する結合親和性を改善するために1またはそれ以上の $C D R$ アミノ酸残基を変化させることも望ましいであろう。これは “親和性成熟 (affinity maturation)” として知られ、例えば抗体のヒト化が結合特異性または親和性の低下をもたらし、復帰突然変異だけでは結合特異性または親和性を十分に改善することができない状況では、場合によりヒト化と併せて実施され得る。種々の親和性成熟方法が当技術分野において公知であり、例えば Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:412-417 (1997) に記載されたインビトロスキニング飽和突然変異誘発、および Wu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6037-6042 (1998) に記載の段階的インビトロ親和性成熟法が挙げられる。

【0107】

本明細書で用いる用語、抗体の “抗原結合部分” (または、単に “抗体の部分”) は、抗原 (例えば、ヒト $M E T$ またはその一部) に特異的に結合する能力を保持する抗体の1またはそれ以上の部分または断片を意味する。全長の抗体の特定の断片が、抗体の抗原結合機能を果たし得ることが示されている。用語 “抗原結合部分” に包含される結合断片の例には、(i) $F a b$ 断片: V_L 、 V_H 、 C_L および $C_H 1$ ドメインからなる一価の断片；(ii) $F (a b')_2$ 断片: ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの $F a b$ 断片を含む二価の断片；(iii) V_H および $C_H 1$ ドメインからなる $F d$ 断片；(iv) 抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインからなる $F v$ 断片、(v) V_H ドメインからなる $d A b$ 断片；および、(vi) 抗原に特異的に結合することが可能な単離された相補性決定領域 ($C D R$) が含まれる。さらに、 $F v$ 断片の二つのドメイン V_L および V_H は、別々の遺伝子によってコードされるが、それらをタンパク質一本鎖として作製することを可能にする合成ペプチドリンカーにより、組換え法を用いて結合させることができ、そこで、 V_L および V_H 領域は、一価の分子形成するペアである (一本鎖 $F v$ (scFv) として知られる)。 V_H および / または V_L を含む抗原結合分子もまた本発明の範囲内である。 V_H の場合、分子はまた、 $C H 1$ 、ヒンジ、 $C H 2$ 、または $C H 3$ 領域

10

20

30

40

50

の1またはそれ以上を含んでいてもよい。かかる単一抗体もまた、用語、抗体の“抗原結合部分”に包含されることが意図される。二重特異性抗体のような単一抗体の他の形態もまた包含される。ダイアボディは二価の二重特異性抗体であり、ここで、 V_H および V_L ドメインは、単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いて、該ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対形成させて2つの抗原結合部位を作り出す。

【0108】

Fab および $F(ab')_2$ 断片のような抗体部分は、全体抗体のパパインまたはペプシン消化などの従来技術を用いて、全抗体から調製することができる。さらに、抗体、抗体の部分および免疫接着分子は、例えば本明細書に記載の、標準的な組換えDNA技術を用いて得ることができる。

10

【0109】

一態様において、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。本明細書で用いる略語“mAb”は、モノクローナル抗体、すなわち、細胞の個々のクローン集団によって合成され、分泌された抗体である。クローン集団は、不死化細胞のクローン集団であり得る。ある態様において、クローン集団における不死化細胞は、ハイブリッド細胞 - ハイブリドーマ - であり、通常、リンパ腫由来の個々の細胞で免疫化した動物由来の個々のBリンパ球の融合により産生される。

【0110】

抗MET抗体のクラス(アイソタイプ)およびサブクラスは、当技術分野で公知の何れかの方法により決定され得る。一般に、抗体のクラスおよびサブクラスは、抗体の特定のクラスおよびサブクラスに特異的な抗体を用いて決定され得る。かかる抗体は、市販されている。クラスおよびサブクラスは、ELISA、ウェスタンブロットならびに他の技術により決定することができる。あるいは、クラスおよびサブクラスは、抗体の重鎖および/または軽鎖の定常ドメインの全部または一部を配列決定し、免疫グロブリンの種々のクラスおよびサブクラスの既知のアミノ酸配列とそのアミノ酸配列を比較し、そして抗体のクラスおよびサブクラスを決定することによって決定することができる。

20

【0111】

抗MET抗体

本発明は、ヒトMETに対する抗体、または該抗体の抗原結合部分に関する。本発明は、キメラおよびヒト化形態の両方の新規の抗MET抗体9006および9338を提供する。図26-30は、これらの抗体の、全長(HCおよびLC)および可変ドメイン(V_H および V_L)重鎖および軽鎖ヌクレオチドならびにアミノ酸配列を示す。以下の表1は、これらの配列の配列番号を提供する。以下の表2は、抗体9006および9338の重鎖および軽鎖CDRAミノ酸配列(キメラ形態とヒト化形態とで同じ)の配列番号を提供する。CDR配列は、IMGT(登録商標)定義にしたがって割り当てられた。

30

【0112】

【表1】

表1:抗体9006および9338の重鎖および軽鎖可変ドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の配列番号

40

	キメラ				ヒト化					
	VH		VL		VH		VL		HC	LC
	DN A	タンパ ク質	DN A	タンパ ク質	DNA	タンパ ク質	DNA	タンパ ク質	タンパ ク質	タンパ ク質
9006	5	6	7	8	13	14	15	16	34	33
9338	9	10	11	12	17	18	19	20	36	35

【表 2】

表 2 : 抗体 9006 および 9338 の CDR の アミノ酸配列の配列番号

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
9006	21	22	23	24	25	26
9338	27	28	29	30	31	32

【0113】

任意の態様において、本発明は、

- ヒト MET への結合について、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25 および 26 のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2 および L-CDR3 を有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

10

- それぞれ配列番号：21、22、23、24、25 および 26 のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2 および L-CDR3 を有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- ヒト MET への結合について、配列番号：6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

20

- ヒト MET への結合について、配列番号：14 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- 重配列番号：6 のアミノ酸配列を含む鎖可変ドメインおよび配列番号：8 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：14 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- ヒト MET への結合について、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31 および 32 のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2 および L-CDR3 を有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

30

- それぞれ配列番号：27、28、29、30、31 および 32 のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2 および L-CDR3 を有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- ヒト MET への結合について、配列番号：10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

40

- ヒト MET への結合について、配列番号：18 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：18 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒト MET のエピトープに結合する、抗 MET 抗体またはその抗原結合部分；

- ヒト MET への結合について、配列番号：34 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番

50

号： 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と競合する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分；

- ヒト M E T への結合について、配列番号： 36 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号： 35 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と競合する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号： 34 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号： 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と同じヒト M E T のエピトープに結合する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号： 36 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号： 35 のアミノ酸配列を含む軽鎖と同じヒト M E T のエピトープに結合する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分を

10

【 0 1 1 4 】

一態様において、本発明は、配列番号： 23 または 29 のアミノ酸配列を含む H - C D R 3 を有する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分を提供する。一態様において、本発明は、配列番号： 26 または 32 のアミノ酸配列を含む L - C D R 3 を有する、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分を提供する。一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、配列番号： 23 または 29 のアミノ酸配列を含む H - C D R 3 および配列番号： 26 または 32 のアミノ酸配列を含む L - C D R 3 を有する。任意の態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、

- 配列番号： 23 の H - C D R 3 配列および配列番号： 26 の L - C D R 3 配列；または
- 配列番号： 29 の H - C D R 3 配列および配列番号： 32 の L - C D R 3 配列

20

を含む。

【 0 1 1 5 】

一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、

- それぞれ配列番号： 21、22 および 23 のアミノ酸配列を含む、H - C D R 1、H - C D R 2 および H - C D R 3；または

- それぞれ配列番号： 27、28 および 29 のアミノ酸配列を含む、H - C D R 1、H - C D R 2 および H - C D R 3

を含む。

【 0 1 1 6 】

一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、

- それぞれ配列番号： 24、25 および 26 のアミノ酸配列を含む、L - C D R 1、L - C D R 2 および L - C D R 3；または

- それぞれ配列番号： 30、31 および 32 のアミノ酸配列を含む、L - C D R 1、L - C D R 2 および L - C D R 3

を含む。

30

【 0 1 1 7 】

一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、

- それぞれ配列番号： 21、22 および 23 のアミノ酸配列を含む、H - C D R 1、H - C D R 2 および H - C D R 3 ならびにそれぞれ配列番号： 24、25 および 26 のアミノ酸配列を含む、L - C D R 1、L - C D R 2 および L - C D R 3；または

- それぞれ配列番号： 27、28 および 29 のアミノ酸配列を含む、H - C D R 1、H - C D R 2 および H - C D R 3 ならびにそれぞれ配列番号： 30、31 および 32 のアミノ酸配列を含む、L - C D R 1、L - C D R 2 および L - C D R 3

を含む。

40

【 0 1 1 8 】

一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、配列番号： 6、10、14 または 18 のアミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインを有する。一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分は、配列番号： 8、12、16 または 20 のアミノ酸配列を含む、軽鎖可変ドメインを有する。一態様において、抗 M E T 抗体またはその抗原結合

50

部分は、配列番号：6、10、14または18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8、12、16または20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する。任意の態様において、抗MET抗体またはその抗原結合部分は、

- 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

- 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；または

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む。

【0119】

任意の態様において、抗MET抗体またはその抗原結合部分は、配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0120】

任意の態様において、抗MET抗体またはその抗原結合部分は、配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0121】

別の面において、本発明は、上記の抗体または部分の変異体を提供し、ここで、該変異体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換により、抗体またはその部分とは異なる。

【0122】

一態様において、本発明は、配列番号：6、10、14または18のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列である重鎖可変ドメインを含む抗MET抗体、または該抗体の抗原結合部分を提供する。任意の態様において、重鎖可変ドメインは、配列番号：6、10、14または18のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列である。一態様において、本発明は、配列番号：8、12、16または20のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列である軽鎖可変ドメインを含む抗MET抗体、または該抗体の抗原結合部分を提供する。任意の態様において、軽鎖可変ドメインは、配列番号：8、12、16または20のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列である。抗MET抗体はまた、上記の重鎖および軽鎖可変ドメインの何れかの組み合わせを含み得る。

【0123】

一態様において、本発明は、配列番号：34または36のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列である重鎖を含む抗MET抗体、または該抗体の抗原結合部分を提供する。任意の態様において、重鎖は、配列番号：34または36のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列である。一態様において、本発明は、配列番号：33または35のアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列である軽鎖を含む抗MET抗体、または該抗体の抗原結合部分を提供する。任意の態様において、軽鎖は、配列番号：33または35のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列である。抗MET抗体はまた、上記の重鎖および軽鎖可変ドメインの何れかの組み合わせを含み得る。

【0124】

配列同一性とも呼ばれるポリペプチドの配列類似性は、一般的には、配列解析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の改変に割り当てられる類似性の尺度を用いて類似の配列をマッチさせる。例えば、GCGは、異なる種の生物に由来する、または野生型タンパク質とそ

10

20

30

40

50

の変異体との間の、相同ポリペプチドなどの密接に関連するポリペプチド間の配列相同性または配列同一性を決定するためにデフォルトパラメータを使用することができる、“Gap”および“Bestfit”などのプログラムを含む。例えば、GCGバージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列はまた、デフォルトまたは推奨パラメータを用いるFASTA(GCGバージョン6.1のプログラム)を用いて比較することができる。FASTA(例えば、FASTA2およびFASTA3)は、クエリ(query)と検索配列との間の最良の重複の領域のアラインメントおよび配列同一性を提供する(Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000))。異なる生物由来の多数の配列を含むデータベースと本発明の配列を比較するとき、別の好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを用いて、コンピュータプログラムBLAST、とりわけblastpまたはtblastnである。例えば、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-402 (1997)(引用により本明細書中に包含させる)を参照のこと。

10

【0125】

相同性について比較されるポリペプチド配列の長さは、一般に、少なくとも約16アミノ酸残基、通常、少なくとも約20残基、より一般的に少なくとも約24残基、一般的に少なくとも約28残基、好ましくは約35以上の残基であり得る。

【0126】

本発明によれば、あるタイプの行われ得るアミノ酸置換は、化学的に反応することができる抗体中の1つまたは複数のシステインを、例えば、限定されないが、アラニンまたはセリンなどの別の残基に変更することである。一態様において、非カノニカルシステインの置換がある。置換は、可変ドメインのCDRまたはフレームワーク領域において、または抗体の定常ドメインにおいて作製することができる。ある態様において、システインはカノニカルである。

20

【0127】

別のタイプの行われ得るアミノ酸置換は、抗体中の潜在的なタンパク質分解部位を除去することである。そのような部位は、可変ドメインのCDRまたはフレームワーク領域において、または抗体の定常領域で起こり得る。システイン残基の置換およびタンパク質分解部位の除去は、抗体産物において不均一性のリスクを減少させ、従ってその均一性を高めることができる。

30

【0128】

別のタイプのアミノ酸置換は、残基の一方または両方を変更することにより、潜在的な脱アミド部位を形成するアスパラギン-グリシン対を除去することである。

【0129】

本発明の変異体のいずれかで行われ得る別のタイプのアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。“保存的アミノ酸置換”は、アミノ酸残基が類似の化学的特性(例えば、電荷または疎水性)を有する側鎖R基を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般的に、保存的アミノ酸置換は、実質的にタンパク質の機能的特性を変化させない。2以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合において、配列同一性%または類似度は、置換の保存的性質を補正するために上方調整され得る。この調整を行うための手段は当業者に周知である。例えば、Pearson, Methods Mol. Biol. 243:307-31(1994)を参照のこと。

40

【0130】

類似した化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸のグループの例としては以下が挙げられる：1)脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；2)脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリンおよびスレオニン；3)アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4)芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；5)塩基性側鎖：リジン、アルギニンおよびヒスチジン；6)酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに7)硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニン。好ましい保存的アミノ酸置換グループは、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルア

50

ラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、およびアスパラギン - グルタミンである。

【 0 1 3 1 】

あるいは、保存的置換は、Gonnet et al., Science 256:1443-45 (1992)において開示される P A M 2 5 0 対数尤度マトリクスにおいて正の値を有するいずれかの変化であると定義され得る。“中程度に保存的な”置換は、P A M 2 5 0 対数尤度マトリクスにおいて負でない値を有するいずれかの変化である。

【 0 1 3 2 】

任意の態様において、本発明の抗体または抗原結合部分のアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させ、(2)酸化に対する感受性を低下させ、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変え、および(4)こうしたアナログの他の物理化学的特性もしくは機能特性を賦与するもしくは改変するが、ヒトMETへの特異的結合性を保持するものを含む。アナログは、天然に存在するペプチド配列への種々の置換を包含し得る。例えば、単一もしくは複数のアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換を、天然に存在する配列中で、例えば分子間接触を形成するドメイン(複数可)の外側のポリペプチドの部分で行い得る。アミノ酸置換はまた、ポリペプチドの活性を改善し得る分子間接触を形成するドメイン(複数可)内でも行い得る。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造的特徴を実質的に変えるべきではない(例えば、置換アミノ酸は、親配列中に存在する免疫グロブリン結合ドメインを構成する逆平行シートを変えるべきでないか、または親配列を特徴付ける他の型の二次構造を破壊すべきではない)。一般に、グリシンおよびプロリンは、逆平行シートで使用されない。当技術分野で認識されるポリペプチドの二次および三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); および、Thornton et al., Nature 354:105 (1991)に記載されている。

【 0 1 3 3 】

本発明の別の面において、抗体は、例えば、PCT公開WO 98 / 5 2 9 7 6 および WO 0 0 / 3 4 3 1 7 に記載の技術を用いて、その免疫原性を低減するために脱免疫化され得る。

【 0 1 3 4 】

ある態様において、本明細書に記載の抗MET抗体または抗原結合部分のいずれかは、以下からなる群より選択される少なくとも1つの機能的特性を有していてもよい。

- マウスまたはニワトリのMETに結合しない；
- SEMAドメイン上に存在する残基を含むヒトMETのエピトープに結合する；
- METの分解を誘導する；
- 1×10^{-9} M以下の K_D でヒトMETに結合する；
- SNU5、EBC1、MKN45、KatoII、OE33およびOkajimaから選択される少なくとも1つの細胞株のインビトロでの増殖を阻害する；
- METリン酸化を阻害する；
- MET下流シグナル伝達を阻害する；
- HGFの存在下または不存在下での初代内皮細胞増殖を阻害する；および
- インビボでの腫瘍増殖を阻害する

または、該機能的特性の任意の組み合わせ。ある態様において、1またはそれ以上の本発明の抗体または抗原結合部分(および、特に、本発明の抗MET抗体組成物)のMETへの結合は、受容体を発現する細胞(すなわち、腫瘍細胞)の成長および増殖を阻害し得る。

【 0 1 3 5 】

ある態様において、本明細書に記載の抗MET抗体または抗原結合部分の何れかは、HGF およびHGF のMETへの結合を阻害し得る。ある態様において、抗体または部分は、未処理のHGFのMETへの結合を阻害し得る。

【 0 1 3 6 】

本明細書で用いる用語“成長を阻害”（例えば、細胞を参照して）には、抗M E T抗体もしくは抗原結合部分または抗M E T抗体組成物と接触させたときに、該抗体または組成物の不存在的下での同じ細胞の増殖と比較して、細胞の増殖（細胞数の増加）または代謝の任意の測定可能な減少を含むことが意図され、例えば、少なくとも約10%、および好ましくはより高い、例えば少なくとも約20%または30%、より好ましくは少なくとも約40%または50%、例えば少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%または99%、さらには約100%の、細胞培養物の増殖の阻害である。以下の実施例に記載の通り、増殖阻害は、例えば、関連する癌細胞株において決定することができる。

【 0 1 3 7 】

本明細書に記載の方法で得られた抗M E T抗体のクラスは、別のクラスに切り替えることができる。本発明の一面では、V LまたはV Hをコードする核酸分子は、それが、C LまたはC Hをコードする核酸配列を含まないように、当技術分野で周知の方法を用いて単離される。次いで、V LまたはV Hをコードする核酸分子は、免疫グロブリン分子の異なるクラスから、C LまたはC Hのアミノ酸配列をコードする核酸配列に作動可能に連結されている。これは、上記の通り、C LまたはC H鎖を含むベクターまたは核酸分子を用いて達成することができる。例えば、元はI g Mであった抗M E T抗体は、I g Gに切り替えることができる。さらに、クラススイッチは、別のI g Gサブクラスに変換するために、例えばI g G 1からI g G 2に変換するために使用されてもよい。所望のアイソタイプを有する本発明の抗体を産生するための好ましい製造法は、抗M E T抗体の重鎖をコードする核酸分子および抗M E T抗体の軽鎖をコードする核酸分子を単離する工程、重鎖の可変ドメインを得る工程、重鎖の可変ドメインを所望のアイソタイプの重鎖の定常ドメインとライゲーションする工程、細胞において軽鎖およびライゲートした重鎖を発現させる工程、および所望のアイソタイプを有する抗M E T抗体を回収する工程を含む。

【 0 1 3 8 】

本発明の抗M E T抗体は、I g G、I g M、I g E、I g A、またはI g D分子であり得る。一態様において、抗M E T抗体は、I g G分子であり、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4サブクラスである。任意の態様において、抗体はI g G 1サブクラスである。

【 0 1 3 9 】

任意の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分の1以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合によって形成される、大きな免疫接着分子の一部であってよい。そのようなイムノアドヘシンの例には、四量体s c F v分子を作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Kipriyanov et al., Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995)）、二価およびピオチニル化s c F v分子を作製するためのシステイン残基、マーカーペプチドおよびC末端ポリヒスチンタグの使用（Kipriyanov et al., Mol. Immunol. 31:1047-1058 (1994)）が含まれる。他の例には、目的の抗原に特異的に結合するイムノアドヘシンにするために、抗体からの1以上のC D Rが共有結合または非共有結合により分子内に組み込まれている場合が含まれる。このような態様では、C D R（複数可）は、より大きなポリペプチド鎖の一部として組み込まれ得て、共有結合的に別のポリペプチド鎖に連結され得るか、または非共有結合的に組み込まれてもよい。

【 0 1 4 0 】

別の態様において、融合抗体またはイムノアドヘシンは、別のポリペプチドに連結された本発明の抗M E T抗体の全部または一部を含んで作製され得る。任意の態様において、抗M E T抗体の可変ドメインのみがポリペプチドに連結されている。任意の態様において、V HおよびV Lドメインが、互いに相互作用して抗原結合部位を形成するように、抗M E T抗体のV Hドメインは、第一のポリペプチドに連結されており、一方、抗M E T抗体のV Lドメインは、第一のポリペプチドと結合する第二のポリペプチドに連結されている。別の好ましい態様において、V Hドメインは、V HおよびV Lドメインが互いに相互作用

10

20

30

40

50

用することができるように（例えば、一本鎖抗体）、リンカーによってV Lドメインから分離されている。V H - リンカー - V L抗体は、その後、目的のポリペプチドに連結される。さらに、融合抗体は、2（またはそれ以上）の単鎖抗体が互いに連結されて作製され得る。これは、単一のポリペプチド鎖上に二価もしくは多価抗体を作製したい場合、または二重特異性抗体を作製したい場合に有用である。

【0141】

単鎖抗体（s c F v）を作製するため、V HおよびV LをコードするDNA断片は、フレキシブルリンカー、例えば、アミノ酸配列（G l y 4 - S e r）3をコードする別の断片に作動可能に連結されており、その結果、V HおよびV L配列は、フレキシブルリンカーにより結合されたV LおよびV Hドメインを有する、連続した一本鎖タンパク質として発現され得る。例えば、Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); and McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)を参照。1つのV HおよびV Lが用いられる場合、一価であり、2つのV HおよびV Lが用いられる場合、二価であり、または2以上のV HおよびV Lが用いられる場合、多価であり得る。二重特異性または多価抗体は、例えば、ヒトM E Tおよび別の分子に特異的に結合するように作製され得る。

10

【0142】

他の態様において、他の修飾抗体は、抗M E T抗体をコードする核酸分子を用いて製造できる。例えば、“カッパボディ”（Ill et al., Protein Eng. 10:949-57 (1997)）、“ミニボディ”（Martin et al., EMBO J. 13:5303-9 (1994)）、“二重特異性抗体”（Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)）、または“一本鎖分子（Janusins）”（Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) および Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)）を、明細書の教示に従って標準的な分子生物学的技術を用いて調製することができる。

20

【0143】

本発明の抗M E T抗体または抗原結合部分は、誘導体化するか、または別の分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）に連結することができる。一般的に、抗体またはその部分は、M E Tの結合が誘導体化または標識によって悪影響を受けないように誘導体化される。従って、本発明の抗体および抗体部分は、本明細書に記載のヒト抗M E T抗体の無傷のおよび改変型の両方を含むことが意図される。例えば、本発明の抗体または抗体部分は、別の分子（ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなど）との抗体または抗体部分の結合を仲介し得る、別の抗体（例えば、二重特異性抗体または二重特異性抗体）などの、1または複数の他の分子化合物に（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合またはその他によって）機能的に結合され得る。

30

【0144】

誘導体化抗体の1つのタイプは、（例えば、二重特異性抗体を作製するために、同じ種類または異なる種類の）2以上の抗体を架橋することによって作製される。好適な架橋剤は、適当なスペーサーで分離された2つの区別できる反応性基を有するヘテロ二官能性であるもの（例えば、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル）、またはホモ二官能性であるもの（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）が含まれる。このようなリンカーは、Pierce Chemical Company、Rockford、ILから入手可能である。

40

【0145】

抗M E T抗体はまた、ポリエチレングリコール（P E G）、メチルもしくはエチル基、または炭水化物基などの化学基で誘導体化することができる。これらの基は、抗体の生物学的特性を改善するのに、例えば血清半減期を増加させるのに、有用である。

【0146】

本発明の抗体はまた、標識され得る。本明細書で用いる用語“標識”または“標識した”は、抗体中の別の分子の挿入を意味する。一態様において、標識は、例えば、放射標識したアミノ酸の挿入、または標識アビジン（例えば、光学的方法または熱量測定法により

50

検出することができる蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン)により検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合などの、検出可能マーカーである。別の態様において、標識またはマーカーは、治療用の、例えば薬物複合体または毒素であり得る。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野で公知であり、用いられ得る。ポリペプチドの標識の例には、以下：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、蛍光ランタニド）、酵素標識（例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、転写活性ポリペプチド、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、ガドリニウムキレートなどの磁性剤、例えば百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシン、ならびにそのアナログまたはホモログなどの毒素が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様にて、標識は、可能性のある立体障害を減ずるために様々な長さのスペースアームにより結合される。

【0147】

任意の態様において、本発明の抗体は、中性形態（両性イオン形態を含む）または正もしくは負に帯電した種として存在し得る。ある態様において、抗体は、薬学的に許容される塩を形成する対イオンと複合体を形成することができる

【0148】

用語“薬学的に許容される塩”は、対イオンが薬学的に許容される無機および有機の酸および塩基から誘導された、1または複数の抗体および1または複数の対イオンを含む複合体を意味する。

【0149】

薬学的に許容される無機塩基には、適当なアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩および他の生理的に許容される金属イオンを含むが、これらに限定されない、金属イオンが含まれる。無機塩基から誘導される塩には、例えば、それらの通常の原子価の、アルミニウム、アンモニウム、カルシウム、コバルト、ニッケル、モリブデン、バナジウム、マンガン、クロム、セレン、スズ、銅、第二鉄、第一鉄、リチウム、マグネシウム、マンガンまたはマンガン塩、カリウム、ルビジウム、ナトリウム、および亜鉛が含まれる。

【0150】

本発明の抗体の薬学的に許容される酸付加塩は、以下の酸：ギ酸、酢酸、アセトアミド、アジピン酸、アスコルビン酸、ホウ酸、プロピオン酸、安息香酸、シヨウノウ、炭酸、シクラミン酸を含む以下の酸から調製することができます。デヒドロコール酸、マロン酸、エドト酸、エチル硫酸、フェンディゾ（fendizoic）酸、メタリン酸、コハク酸、グリコール酸、グルコン酸、乳酸、リンゴ酸、酒石酸、タンニン酸、クエン酸、硝酸、アスコルビン酸、グルクロン酸、マレイン酸、葉酸、フマル酸、プロピオン酸、ピルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、安息香酸、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リシン、イソクエン、トリフルオロ酢酸、パモ酸、プロピオン酸、アントラニル酸、メシル酸、オロチン酸、シュウ酸、オキサロ酢酸、オレイン酸、ステアリン酸、サリチル酸、アミノサリチル、ケイ酸、p-ヒドロキシ安息香酸、ニコチン酸、フェニル酢酸、マンデル酸、エンボン酸、スルホン酸、メタンスルホン酸、リン酸、ホスホン酸、エタンスルホン酸、エタンジスルホン、アンモニウム、ベンゼンスルホン酸、パントテン酸、ナフタレンスルホン酸、トルエンスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、スルファニル酸、硫酸、硝酸、亜硝酸、硫酸モノメチルエステル、シクロヘキシルアミノスルホン酸、 α -ヒドロキシ酪酸、グリシン、グリシルグリシン、グルタミン酸、カコジル酸、ジアミノヘキサン、

10

20

30

40

50

カンファースルホン酸、グルコン酸、チオシアン酸、オキソグルタル酸、ピリドキサル5-リン酸、クロロフェノキシ酢酸、ウンデカン酸、N-アセチル-L-アスパラギン、ガラクトール酸およびガラクトン酸が含まれるが、これらに限定されない、酸から製造可能である。

【0151】

薬学的に許容される有機塩基としては、トリメチルアミン、ジエチルアミン、N、N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジベンジルアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグルミン(N-メチルグルカミン)、プロカイン、環状アミン、第四級アンモニウムカチオン、アルギニン、ベタイン、カフェイン、クレミゾール、2-エチルアミノエタノール、2-ジエチルアミノエタノール、2-ジメチルアミノエタノール、エタンジアミン、ブチルアミン、エタノールアミン、エチレンジアミン、N-エチルモルホリン、N-エチルピペリジン、エチルグルカミン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イミダゾール、イソプロピルアミン、メチルグルカミン、モルホリン、ピペラジン、ピリジン、ピリドキシン、ネオジウム、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン、テオブロミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、メチルアミン、タウリン、コール酸塩、6-アミノ-2-メチル-2-ヘプタノール、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸、ストロンチウム、トリシン、ヒドラジン、フェニルシクロヘキシルアミン、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ-トリス(ヒドロキシメチル)メタン、N-(2-アセトアミド)-2-アミノエタンスルホン酸、1,4-ピペラジンジエタンスルホン酸、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、1,3-ビス[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]プロパン、4-モルホリンプロパンスルホン酸、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-エタンスルホン酸、2-[(2-ヒドロキシ-1,1-ビス(ヒドロキシメチル)エチル)アミノ]エタンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸、4-(N-モルホリノ)ブタンスルホン酸、3-(N,N-ビス[2-ヒドロキシエチル]アミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、2-ヒドロキシ-3-[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミノ]-1-プロパンスルホン酸、4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)、ピペラジン-1,4-ビス(2-ヒドロキシプロパンスルホン酸)二水和物、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンプロパンスルホン酸、N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(4-ブタンスルホン酸)、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-3-アミノプロパンスルホン酸、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-4-アミノブタンスルホン酸、N-(1,1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル)-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸、2-(シクロヘキシルアミノ)エタンスルホン酸、3-(シクロヘキシルアミノ)-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸、3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸、N-(2-アセトアミド)イミノ二酢酸、4-(シクロヘキシルアミノ)-1-ブタンスルホン酸、N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]グリシン、2-アミノ-2-(ヒドロキシメチル)-1,3-プロパンジオール、およびトロメタモールが挙げられる。

【0152】

抗MET抗体組成物

一面において、本発明は、少なくとも2つの本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む抗体組成物を提供する。用語“抗MET抗体組成物”は、少なくとも2つの抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む組成物を意味する。

【0153】

一態様において、抗体組成物は、第一の抗MET抗体またはその抗原結合部分および第二の抗MET抗体またはその抗原結合部分を含み、ここで、第一の抗MET抗体は、以下

10

20

30

40

50

からなる群より選択される：

- それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含む、H - C D R 1、H - C D R 2、H - C D R 3、L - C D R 1、L - C D R 2およびL - C D R 3を有する抗体と同じヒトM E Tのエピトープに結合する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- ヒトM E Tへの結合について、配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- ヒトM E Tへの結合について、配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 重配列番号：6のアミノ酸配列を含む鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトM E Tのエピトープに結合する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトM E Tのエピトープに結合する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：23のアミノ酸配列を含むH - C D R 3を有する抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：26のアミノ酸配列を含むL - C D R 3を有する抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：23のアミノ酸配列を含むH - C D R 3および配列番号：26のアミノ酸配列を含むL - C D R 3を有する抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH - C D R 1、H - C D R 2およびH - C D R 3を有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- それぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL - C D R 1、L - C D R 2およびL - C D R 3を有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH - C D R 1、H - C D R 2およびH - C D R 3ならびにそれぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL - C D R 1、L - C D R 2およびL - C D R 3を有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：6または14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：8または16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8アミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：6のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：14のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗M E T抗体またはその抗原結合部分；
- 配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む

軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：34のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

そして、第二の抗MET抗体は、以下からなる群より選択される：

- ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含む、H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- ヒトMETへの結合について、配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- ヒトMETへの結合について、配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3および配列番号：32のアミノ酸配列を含むL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- それぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3およびそれぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：10または18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを有する抗MET抗体またはその抗原結合部分、；

- 配列番号：12または20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：10のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%

10

20

30

40

50

、 96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：18のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；

- 配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：36のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分。

上記の第一および第二の抗MET抗体の何れかの組み合わせが意図される。

【0154】

一態様において、抗体組成物は、

- ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- ヒトMETへの結合について、それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0155】

一態様において、抗体組成物は、

- それぞれ配列番号：21、22、23、24、25および26のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：27、28、29、30、31および32のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3、L-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0156】

一態様において、抗体組成物は、

- ヒトMETへの結合について、配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- ヒトMETへの結合について、配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0157】

一態様において、抗体組成物は、

10

20

30

40

50

- ヒトMETへの結合について、配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- ヒトMETへの結合について、配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0158】

一態様において、抗体組成物は、

- ヒトMETへの結合について、配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- ヒトMETへの結合について、配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と競合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0159】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0160】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0161】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体と同じヒトMETのエピトープに結合する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0162】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：23のアミノ酸配列を含むH-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：29のアミノ酸配列を含むH-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 3 】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：26のアミノ酸配列を含むL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：32のアミノ酸配列を含むL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 4 】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：23のアミノ酸配列を含むH - CDR3および配列番号：26のアミノ酸配列を含むL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：29のアミノ酸配列を含むH - CDR3および配列番号：32のアミノ酸配列を含むL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 5 】

一態様において、抗体組成物は、

- それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH - CDR1、H - CDR2およびH - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含むH - CDR1、H - CDR2およびH - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 6 】

一態様において、抗体組成物は、

- それぞれ配列番号：24、25および26のアミノ酸配列を含むL - CDR1、L - CDR2およびL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL - CDR1、L - CDR2およびL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 7 】

一態様において、抗体組成物は、

- それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH - CDR1、H - CDR2およびH - CDR3およびそれぞれ配列番号：24、25および26を含むL - CDR1、L - CDR2およびL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含むH - CDR1、H - CDR2およびH - CDR3およびそれぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL - CDR1、L - CDR2およびL - CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 8 】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

【 0 1 6 9 】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

- 配列番号：22のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：26のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：28のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

を含む。

10

20

30

40

50

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

【0170】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

10

【0171】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：6のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：10のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

20

第一および第二の抗体の上記の同一性パーセントの任意の組合せが意図される。

【0172】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：14のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：18のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分を含む。

30

第一および第二の抗体の上記の同一性パーセントの任意の組合せが意図される。

【0173】

一態様において、抗体組成物は、

- 配列番号：34のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：36のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%同一のアミノ酸配列を有する軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

40

50

を含む。

第一および第二の抗体の上記の同一性パーセントの任意の組合せが意図される。

【0174】

二重特異性結合分子

さらなる面において、本明細書に記載の何れか2つの個々の抗体の結合特異性は、1つの二重特異性結合分子に組み込まれ得る。例えば、二重特異性結合分子は、抗MET抗体9006および9338の結合特異性を有し得る。ある態様において、二重特異性結合分子は、

- それぞれ配列番号：21、22および23のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3およびそれぞれ配列番号：24、25および26を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- それぞれ配列番号：27、28および29のアミノ酸配列を含むH-CDR1、H-CDR2およびH-CDR3およびそれぞれ配列番号：30、31および32のアミノ酸配列を含むL-CDR1、L-CDR2およびL-CDR3を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

の結合特異性を有し得る。

【0175】

ある態様において、二重特異性結合分子は、

- 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

の結合特異性を有し得る。

【0176】

ある態様において、二重特異性結合分子は、

- 配列番号：14のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：18のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号：20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

の結合特異性を有し得る。

【0177】

ある態様において、二重特異性結合分子は、

- 配列番号：34のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：33のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分；および

- 配列番号：36のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号：35のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する、抗MET抗体またはその抗原結合部分

の結合特異性を有し得る。

【0178】

二重特異性結合分子は、二重可変ドメイン抗体であってよく、すなわち、抗体の2つのアームが、2つの異なる可変ドメインを含むか、または二重特異性Fabフラグメントまたは二重特異性scFvのような抗体フラグメントの形態であり得る。

【0179】

核酸分子およびベクター

本発明はまた、本明細書に記載の抗MET抗体またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を提供する。ある態様において、異なる核酸分子は、抗MET抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖アミノ酸配列をコードする。他の態様において、同じ核酸分子は、抗MET抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖アミノ酸配列をコードする。

【0180】

他に特記されない限り、ヌクレオチド配列への言及は、その相補体を包含する。したが

10

20

30

40

50

って、特定の配列を有する核酸への言及は、その相補的配列を有するその相補鎖を包含すると理解されるべきである。本明細書で言及される用語“ポリヌクレオチド”は、長さ少なくとも10塩基のヌクレオチドのポリマー形態、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのいずれか、またはヌクレオチドのいずれかのタイプの修飾された形態を意味する。この用語は、一本鎖および二本鎖形態を含む。

【0181】

本発明はまた、上記のヌクレオチド配列または配列番号：6、8、10、12、14、16、18、20および33-36からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の1以上に、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を提供する。核酸配列の文脈中、用語“配列同一性パーセント”は、最大一致のために整列させた場合に同じである2つの配列中の残基を意味する。配列同一性比較の長さは、少なくとも約9ヌクレオチド、通常は少なくとも約18ヌクレオチド、より通常には少なくとも約24ヌクレオチド、一般的には少なくとも約28ヌクレオチド、より一般的には少なくとも約32ヌクレオチド、好ましくは少なくとも約36、48またはそれ以上のヌクレオチドの長さであり得る。ヌクレオチド配列同一性を測定するために使用することができ、当技術分野で公知の多数の異なるアルゴリズムがある。例えば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.0 (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin) 中のプログラムであるFASTA、Gap、またはBestfitを使用して比較され得る。FASTAは、クエリー配列と検索配列と間の最適なオーバーラップの領域のアライメントおよび配列同一性パーセントを提供する。(Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); 引用により本明細書に包含させる)。他に特記されない限り、特定のプログラムまたはアルゴリズムのデフォルトのパラメータが使用される。例えば、核酸配列間の配列同一性パーセントは、そのデフォルトパラメータ(ワードサイズ6およびスコアリングマトリックスのためのNOPAMファクター(factor))を用いてFASTAを使用して、または引用により本明細書に包含させるGCGバージョン6.1中に提供されているようなそのデフォルトパラメータを用いてGapを使用して、決定され得る。

【0182】

一面において、本発明は、配列番号：5、7、9、11、13、15、17および19からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。ある態様において、核酸分子は、配列番号：5および7、9および11、13および15または17および19のヌクレオチド配列を含み得る。

【0183】

上記の態様のいずれかにおいて、核酸分子は単離され得る。

【0184】

さらなる面において、本発明は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合部分の鎖の1つを発現するのに好適なベクターを提供する。本明細書で用いる用語“ベクター”は、それが連結されている別の核酸を輸送できる核酸分子を意味する。ある態様において、ベクターは、プラスミド、すなわち、付加的なDNAセグメントを連結することができるDNAの環状の二本鎖部分である。ある態様において、ベクターは、付加的なDNAセグメントがウイルスゲノムに連結することができるウイルスベクターである。ある態様において、ベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他の態様では、ベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書中、“組み換え発現ベクター”(または、単に“発現ベクター”)と称される。

【0185】

本発明は、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分の重鎖、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分の軽鎖、または本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖の両方をコードする核酸分子を含むベクターを提供する。本発明はさらに、融合タンパク質、修飾抗体、抗体断片、およびそのプローブをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。

【0186】

抗M E T抗体またはその部分の重鎖および/または軽鎖をコードする核酸分子は、そのような抗体または部分を産生する任意の供給源から単離され得る。種々の態様において、核酸分子は、ヒトM E T抗原で免疫した動物から、またはそのようなB細胞から産生された不死化細胞から単離された抗M E T抗体を発現するB細胞から単離される。抗体をコードする核酸を単離する方法は当技術分野において周知である。mRNAを単離し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または抗体遺伝子のcDNAクローニングにおいて使用するためのcDNAを作製するために使用することができる。任意の態様において、本発明の核酸分子は、単離よりむしろ合成することができる。

【0187】

ある態様において、本発明の核酸分子は、任意の供給源由来の重鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列にインフレームで結合された、本発明の抗M E T抗体または抗原結合部分由来のV Hドメインをコードするヌクレオチド配列を含み得る。同様に、本発明の核酸分子は、任意の供給源由来の軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列にイン

【0188】

本発明のさらなる面では、重鎖(V H)および/または軽鎖(V L)の可変ドメインをコードする核酸分子は、完全長抗体遺伝子に“変換”されてもよい。一態様において、V HまたはV Lドメインをコードする核酸分子は、V Hセグメントがベクター内のC Hセグメント(複数可)に作動可能に連結され、および/またはV Lセグメントが、ベクター内のC Lセグメントに作動可能に連結されるように、重鎖定常(C H)または軽鎖定常(C L)ドメインのアミノ酸配列を既にコードする発現ベクター中に挿入することにより完全長抗体遺伝子に変換される。別の態様において、V Hおよび/またはV Lドメインをコードする核酸分子は、標準的な分子生物学的技術を用いて、C Hおよび/またはC Lドメインをコードする核酸分子にV Hおよび/またはV Lドメインをコードする核酸分子を結合させること、例えばライゲーションすることにより、全長抗体遺伝子に変換される。その後、完全長の重鎖および/または軽鎖をコードする核酸分子は、それらが導入された細胞から発現させることができ、抗M E T抗体が単離される。

【0189】

核酸分子は、抗M E T抗体を組換え的に大量に発現させるために使用されてもよい。本明細書に記載の通り、核酸分子はまた、キメラ抗体、二重特異性抗体、一本鎖抗体、イムノアドヘシン、二重特異性抗体、突然変異抗体および抗体誘導体を産生するために使用されてもよい。

【0190】

別の態様において、本発明の核酸分子は、特定の抗体配列に対するプローブまたはPCRプライマーとして使用される。例えば、核酸は、診断方法のプローブとして、またはとりわけ抗M E T抗体の可変ドメインをコードする付加的な核酸分子を単離するために使用され得るDNAの領域を増幅するためのPCRプライマーとして、使用することができる。ある態様において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。ある態様において、オリゴヌクレオチドは、目的の抗体の重鎖および軽鎖の高度可変ドメインに由来する。ある態様において、本明細書に記載の通り、オリゴヌクレオチドは、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分の1以上のCDRの全部または一部をコードする。

【0191】

別の態様において、核酸分子およびベクターは、突然変異した抗M E T抗体を作製するために使用されてもよい。抗体は、抗体の結合特性を変化させるために、例えば、重鎖および/または軽鎖の可変ドメインにおいて変異させてもよい。例えば、突然変異は、抗M E T抗体の K_D を増加または減少させる、 k_{off} を増加または減少させる、あるいは抗体の結合特異性を変えるために、C D R領域の1以上に行われ得る。別の態様において、1以上の変異は、本発明のモノクローナル抗体における生殖細胞系と比較して変化することが知られているアミノ酸残基で行われる。変異は、可変ドメインのC D R領域またはフレームワーク領域においてか、または定常ドメインにおいて作製することができる。好ましい態様において、変異は可変ドメインにおいて作製される。ある態様において、1以上の変異は、本発明の抗体またはその抗原結合部分の可変ドメインのC D R領域またはフレームワーク領域において生殖細胞系と比較して変化することが知られているアミノ酸残基で行われる。

10

【0192】

別の態様では、得られたフレームワーク領域(複数可)が対応する生殖細胞系遺伝子のアミノ酸配列を有するように、フレームワーク領域(複数可)が変異している。突然変異は、抗M E T抗体の半減期を増加させるためにフレームワーク領域または定常ドメインにおいて作製され得る。例えば、P C T公開W O O 0 / 0 9 5 6 0を参照のこと。フレームワーク領域または定常ドメインにおける突然変異はまた、抗体の免疫原性を変化させることができ、および/または別の分子への共有結合または非共有結合のための部位を提供する。本発明によれば、単一の抗体は、可変ドメインのC D Rまたはフレームワーク領域のいずれか1以上において、または定常ドメインにおいて変異を有していてもよい。

20

【0193】

ある態様において、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分は、遺伝子が、転写および翻訳調節配列のような必要な発現制御配列に作動可能に連結されるように、上記で得られた、部分的または完全長の軽鎖および重鎖をコードするD N Aを発現ベクターに挿入することによって発現される。発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(A A V)、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスなどの植物ウイルス、コスミド、Y A C、E B V由来エピソームなどが含まれる。抗体遺伝子は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するそれらの意図された機能を果たすように、ベクターに連結され得る。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択され得る。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は別々のベクターに挿入され得る。一態様において、両遺伝子は同じ発現ベクターに挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法によって発現ベクターに挿入され得る(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション)。

30

【0194】

便利なベクターは、上記のように、任意のV HまたはV L配列が容易に挿入および発現され得るように操作された適切な制限部位を有する、機能的に完全なヒトC HまたはC L免疫グロブリン配列をコードするものである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは通常、挿入されたJ領域におけるスプライスドナー部位とヒトCドメインに先行するスプライスアクセプター部位との間で起こり、またヒトC Hエキソン内に生じるスプライス領域でも起こる。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域の下流の天然の染色体上の部位で生じ得る。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが免疫グロブリン鎖のアミノ末端にインフレームで連結されるようにベクターにクローニングされ得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)であり得る。

40

【0195】

50

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を担持し得る。当業者が認めるように、発現ベクターの設計は、調節配列の選択を含め、形質転換すべき宿主細胞の選定、所望タンパク質の発現レベルなどの因子に左右され得る。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列には、哺乳動物細胞においてタンパク質発現の高レベルを目的とするウイルス要素、例えば、レトロウイルスLTRに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサー、サイトメガロウイルス(CMV)(例えば、CMVプロモーター/エンハンサー)、シミアンウイルス40(SV40)(例えば、SV40プロモーター/エンハンサー)、アデノウイルス、(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、ポリオーマおよび強力な哺乳動物プロモーター、例えば天然の免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターが含まれる。ウイルス性調節要素およびその配列のさらなる記述について、例えば、米国特許第5,168,062号、同第4,510,245号および同第4,968,615号参照。プロモーターおよびベクターの記載を含む、植物における抗体の発現方法、ならびに植物の形質転換は、当技術分野で公知である。例えば、米国特許第6,517,529号を参照のこと。細菌細胞または真菌細胞、例えば、酵母細胞におけるポリペプチドの発現法もまた、当技術分野で周知である。

【0196】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞(例えば、複製起点)および選択可能マーカー遺伝子でのベクターの複製を調節する配列などのさらなる配列を有していてもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号および同第5,179,017号を参照)。例えば、一般的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。例えば、選択可能マーカー遺伝子には、(メトトレキサート選択/増幅とともにdhfr-宿主細胞において使用するための)ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子、(G418選択用の)neo遺伝子、およびグルタミン酸合成酵素遺伝子が含まれる

【0197】

本明細書中で用いる用語“発現制御配列”は、それらが連結するコーディング配列の発現およびプロセッシングをもたらすのに必要なポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列は、適する転写開始、終止、プロモーターおよびエンハンサー配列;例えばスプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的RNAプロセッシングシグナル;細胞質mRNAを安定化する配列;翻訳効率を増強する配列(すなわち、Kozakコンセンサス配列);タンパク質安定性を増強する配列;および、所望により、タンパク質分泌を増強する配列を含む。このような調節配列の性質は宿主生物に応じて異なる。原核生物では、このような調節配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含む。真核生物では、一般に、このような調節配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。用語“調節配列”は、最低でも、その存在が発現およびプロセッシングに必須である成分を意味しており、また、その存在が有利である追加成分、例えばリーダー配列や融合パートナー配列も含む。

【0198】

本発明の抗体および抗体組成物を産生するハイブリドーマ法

任意の態様において、本発明は、(a)非ヒトトランスジェニック動物をMET、METの一部またはMETを発現する細胞もしくは組織で免疫化し;(b)該トランスジェニック動物にMETに対する免疫応答をマウントするのを可能にし;(c)該トランスジェニック動物から抗体産生細胞を単離し;(d)抗体産生細胞を不死化し;(e)不死化した抗体産生細胞の個々のモノクローナル集団を生成し;そして、(f)不死化した抗体産生細胞をスクリーニングして、METに対する抗体を同定すること、を含む、METに対するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を産生する細胞株を作製するための方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 9 】

別の面において、本発明は、ヒト抗M E T抗体を産生する細胞株を提供する。ある態様において、該細胞株は、ハイブリドーマ細胞株である。ある態様において、ハイブリドーマは、上記の通り、マウスハイブリドーマである。他の態様において、ハイブリドーマは、非ヒト、ラットなどの非マウス種、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマで産生される。別の態様において、ハイブリドーマは、ヒトハイブリドーマである。

【 0 2 0 0 】

別の態様において、トランスジェニック動物は、M E T抗原で免疫化され、初代細胞、たとえば脾臓または末梢血B細胞は、免疫化されたトランスジェニック動物から単離され、そして所望の抗原に特異的な抗体を産生する個々の細胞が識別される。個々の細胞からポリアデニル化m R N Aを単離し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(R T - P C R)を、可変ドメイン配列にアニールするセンスプライマー、例えば、ヒト重鎖および軽鎖の可変ドメイン遺伝子のF R 1領域のほとんどまたは全てを認識する縮重プライマー、および定常または連結領域配列にアニールするアンチセンスプライマーを用いて行う。重鎖および軽鎖可変ドメインのc D N Aは、そのような重鎖および または コンセンサスドメインなどのそれぞれの免疫グロブリン定常領域を有するキメラ抗体として、任意の適する宿主細胞、例えば骨髓腫細胞中でクローニングし、発現されている。Babcook et al., Proc Natl Acad Sci USA 93:7843-48 (1996)を参照のこと。抗M E T抗体は、本明細書中に記載のように同定し、単離することができる。

【 0 2 0 1 】

ファージディスプレイライブラリー

本発明は、ヒト抗体のライブラリーをファージ上に合成する工程、該ライブラリーをM E Tまたはその抗体結合部分でスクリーニングする工程、M E Tに結合するファージを単離する工程、およびファージから抗体を得る工程を含む、抗M E T抗体またはその抗原結合部分を産生する方法を提供する。一例として、ファージディスプレイ技術に使用するための抗体のライブラリーを調製するための一方法は、非ヒト動物をM E Tまたはその抗原部分で免疫化して免疫応答を作成する工程、免疫化した動物から抗体産生細胞を抽出する工程；抽出した細胞から本発明の抗体の重鎖および軽鎖をコードするR N Aを単離する工程、R N Aを逆転写してc D N Aを作成する工程、プライマーを用いてc D N Aを増幅する工程、および抗体がファージ上で発現されるようにファージディスプレイベクターへc D N Aを導入する工程を含む。本発明の組換え抗M E T抗体は、このようにして得ることができる。

【 0 2 0 2 】

本発明の組換えヒト抗M E T抗体は、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。好ましくは、ライブラリーは、B細胞から単離されたm R N Aから調製されたヒトV LおよびV H c D N Aを用いて生成された、s c F vファージディスプレイライブラリーである。そのようなライブラリーを調製およびスクリーニングするための方法は当技術分野で公知である。ファージディスプレイライブラリーを作製するためのキットが市販されている(例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；および、Stratagene SurfZAP(商標) phage display kit、カタログ番号240612)。抗体ディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングに使用することができる他の方法および試薬もある(例えば、米国特許第5,223,409号；P C T公開WO92/18619、WO91/17271、WO92/20791、WO92/15679、WO93/01288、WO92/01047、およびWO92/09690；Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991)；Hay et al., Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 (1992)；Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)；McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)；Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993)；Hawkins et al., J Mol Biol 226:89-896 (1992)；Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)；Gram et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580 (1992)；Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (19

10

20

30

40

50

91); Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19:4133-4137 (1991); and Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982 (1991) (全て、引用により本明細書中に包含させる)。

【0203】

一態様において、所望の特徴を有するヒト抗MET抗体を単離および産生するために、本明細書に記載のヒト抗MET抗体は、第一に、PCT公開WO93/06213(引用により本明細書中に包含させる)に記載のエピトープインプリンティング法を用いて、METに対して同様の結合活性を有するヒト重鎖および軽鎖配列を選択するために用いられる。この方法で用いる抗体ライブラリーは、好ましくは、PCT公開WO92/01047、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); および、Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993)(全て、引用により本明細書中に包含させる)に記載の通りに、製造およびスクリーニングされたscFvライブラリーである。scFv抗体ライブラリーは、好ましくはヒトMETを抗原として用いてスクリーニングされる。

10

【0204】

最初のヒトVLおよびVHドメインが選択されると、“ミックスアンドマッチ”試験が実行可能であり、そこで、最初に選択されたVLおよびVHセグメントの異なる対が、好ましいVL/VH対の組み合わせを選択するためにMET結合についてスクリーニングされる。また、抗体の質をさらに改善するために、好ましいVL/VH対(複数可)のVLおよびVHセグメントを、好ましくは、VHおよび/またはVLのCDR3領域内で、天然の免疫応答中の抗体の親和性成熟を担当するインビボでの体細胞変異プロセスにおいて、ランダムに変異させることができる。このインビボ親和性成熟は、VHCDR3またはVLCDR3のそれぞれに相補的なPCRプライマーを用いてVHおよびVLドメインを増幅することによって達成することができ、そこで、プライマーは、得られたPCR産物が、ランダムな突然変異がVHおよび/またはVLCDR3領域に導入されたVHおよびVLセグメントをコードするように、特定の位置に4つのヌクレオチド塩基のランダム混合物を“スパイク”されている。これらのランダムに突然変異したVHおよびVLセグメントは、METへの結合について再スクリーニングされ得る。

20

【0205】

組換え免疫グロブリンディスプレイライブラリーからの本発明の抗MET抗体のスクリーニングおよび単離後、選択された抗体をコードする核酸は、ディスプレイパッケージから(例えば、ファージゲノムから)から回収することができ、他の発現ベクターに標準的な組換えDNA技術によってサブクローニングされる。所望であれば、本明細書に記載されるように、核酸はさらに、本発明の他の抗体形態を作成するために操作され得る。コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングによって単離された組換えヒト抗体を発現させるために、本明細書に記載の通り、抗体をコードするDNAを、組換え発現ベクターにクローニングし、哺乳動物宿主細胞に導入される。

30

【0206】

非ハイブリドーマ宿主細胞ならびに抗体および抗体組成物の製造法

本発明のさらなる面は、本発明の抗体組成物ならびに抗体およびその抗原結合部分の製造法に関する。本発明のこの面の一態様は、抗体を発現し得る組換え宿主細胞を提供し、抗体の発現に適した条件下で該宿主細胞を培養し、そして得られた抗体を単離することを含む、本明細書で定義される抗体を産生するための方法に関する。そのような組換え宿主細胞におけるそのような発現によって産生される抗体は、本明細書中、“組換え抗体”と称される。本発明はまた、そのような宿主細胞の子孫細胞、およびそれにより産生される抗体を提供する。

40

【0207】

本明細書で用いる用語“組換え宿主細胞”(または、単に“宿主細胞”)は、組換え発現ベクターが導入された細胞を意味する。本発明は、例えば、上記の本発明のベクターを含み得る宿主細胞を提供する。本発明はまた、例えば、本発明の抗MET抗体またはその抗原結合部分の、重鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、軽鎖また

50

はその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、あるいはその両方、を含む、宿主細胞を提供する。“組換え宿主細胞”および“宿主細胞”は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も意味することが理解されるべきである。突然変異または環境的影響によって、続く世代で特定の修飾が起こりうるため、こうした子孫は、実際、親細胞と同一でない可能性もあるが、なお、本明細書で用いる用語“宿主細胞”の範囲内に含まれる。

【0208】

抗MET抗体をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含むベクターは、好適な哺乳動物細胞、植物細胞、細菌細胞または酵母宿主細胞のトランスフェクションに使用され得る。形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための何れか公知の方法によって行うことができる。哺乳動物細胞への異種ポリヌクレオチドを導入するための方法は当技術分野で周知であり、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム内へのポリヌクレオチド（複数可）の封入、および核へのDNAの直接的マイクロインジェクションが含まれる。さらに、核酸分子は、ウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導入することができる。細胞を形質転換する方法は当技術分野で周知である。例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、および同第4,959,455号を参照のこと。植物細胞を形質転換する方法は当技術分野で知られており、例えば、アグロバクテリウム媒介形質転換、微粒子銃形質転換、直接注入、エレクトロポレーション、およびウイルス形質転換が含まれる。細菌および酵母細胞を形質転換する方法も当技術分野で周知である。

【0209】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野において周知であり、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、293フリースタイル細胞（Invitrogen）、NIH-3T3細胞、Hela細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、アフリカミドリサル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、A549細胞、および多数の他の細胞株が含まれる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有するかを決定することによって選択される。使用することができる他の細胞株は、Sf9またはSf21細胞などの昆虫細胞株である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現を可能にするために十分な期間、宿主細胞を培養することによって産生されるか、または、より好ましくは、宿主細胞が増殖する培養培地中に抗体を分泌させる。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培養培地から回収することができる。植物宿主細胞には、例えば、タバコ、シロイヌナズナ、ウキクサ、トウモロコシ、小麦、ジャガイモなどが含まれ、細菌宿主細胞としては、大腸菌およびストレプトミセス種が含まれる。酵母宿主細胞には、分裂酵母、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）およびピキア酵母が含まれる。

【0210】

さらに、その産生細胞株からの本発明の抗体またはその抗原結合部分の発現は、公知の多数の技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミン合成酵素遺伝子発現系（GS系）は、特定の条件下で発現を増強するための一般的なアプローチである。GS系は、EP特許0216846号、同第0256055号、同第0323997号および同第0338841号に関連して、全体または部分的に議論されている。

【0211】

また、異なる細胞株によってまたはトランスジェニック動物において発現される抗体は、互いに異なるグリコシル化パターンを有することが多い。しかしながら、本明細書において提供される核酸分子によってコードされるか、または本明細書に提供されるアミノ酸配列を含むすべての抗体は、抗体のグリコシル化状態に関係なく、より一般的には、翻訳

10

20

30

40

50

後修飾（複数可）の有無に関わらず、本発明の一部である。

【0212】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも2つの抗M E T抗体を含む抗体組成物を産生するための方法に関し、該方法は、

- 第一の宿主細胞が、本発明の第一の抗M E T抗体を発現可能であり、第二の宿主細胞が、本発明の第二の抗M E T抗体を発現可能である、少なくとも第一および第二の宿主細胞を提供し；
- 抗M E T抗体の発現に適する条件下で第一および第二の宿主細胞を培養し；そして
- 得られた抗体を単離すること

を含む。

10

【0213】

本発明の抗体またはその抗原結合部分または抗体組成物は、組み換えモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造について当技術分野で一般的に公知の方法により製造され得る。故に、本発明の単一抗体の製造の場合、組換えモノクローナル抗体の製造について当技術分野で公知の何れかの方法が使用可能である。抗体の混合物を含む本発明の抗体組成物の製造に関して、個々の抗体は別個に製造され得て、すなわち、各抗体を別個のバイオリアクターで製造するか、または個々の抗体を、単一のバイオリアクターで共に製造し得る。抗体組成物が2以上のバイオリアクターで製造されるとき、精製された抗体組成物は、各バイオリアクターから個々に精製された上清から得られた抗体を集めることにより得られ得る。多数のバイオリアクターにおけるポリクローナル抗体組成物の製造のための種々の方法が、WO 2009/129814（引用により本明細書中に包含される）に記載されており、該方法では、細胞株または抗体製剤を上流のより後の時点で、または下流のプロセッシングの前もしくはプロセッシング中に組み合わせる。

20

【0214】

単一のバイオリアクター中で個々の複数の抗体を製造する場合、これは、例えばWO 2004/061104またはWO 2008/145133（両方とも、引用により本明細書中に包含される）に記載の通りに実施され得る。WO 2004/061104に記載の方法は、個々の宿主細胞のゲノムへの抗体コーディング配列の部位特異的組み込みに基づき、WO 2008/145133に記載の方法は、単一のバイオリアクターにおける抗体の製造にランダム組み込みを用いる別法に関する。

30

【0215】

本発明の抗体および組成物を製造するのに好適な方法に関するさらなる情報は、WO 2012/059857（引用により本明細書中に包含される）に見出され得る。

【0216】

トランスジェニック動物および植物

本発明の抗M E T抗体およびその抗原結合部分はまた、目的の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳動物または植物の作製、およびそれから回収可能な形態での抗体の産生を介してトランスジェニック的に製造することができる。哺乳動物におけるトランスジェニック生産に関連し、抗M E T抗体および部分は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁中に産生され、乳汁から回収することができる。例えば、米国特許第5,827,690号、同第5,756,687号、同第5,750,172号、および同第5,741,957号を参照のこと。ある態様において、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒトトランスジェニック動物は、上記の通り、ヒトM E Tまたはその免疫原性部分で免疫化される。植物において抗体を作製する方法は、例えば、米国特許第6,046,037号および同第5,959,177号に記載されている。

40

【0217】

ある態様において、非ヒトトランスジェニック動物または植物は、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分をコードする1以上の核酸分子（例えば、抗M E T抗体またはその抗原結合部分をコードする上記の核酸分子の何れか）を、標準的なトランスジェニック技術によって動物または植物に、導入することにより作製される。例えば、米国特許第

50

6, 417, 429号を参照のこと。トランスジェニック動物を作製するために用いられるトランスジェニック細胞は、胚性幹細胞または体細胞または受精卵であることが得る。トランスジェニック非ヒト生物は、キメラ、非キメラのヘテロ接合、および非キメラホモ接合体であり得る。例えば、例えば、Hogan et al., *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson et al., *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); および、Pinkert, *Transgenic 動物 Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999)参照。ある態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、目的の重鎖および/または軽鎖をコードするターゲティング構築物による標的破壊および置換を有する。非ヒトトランスジェニック動物または植物は、例えば、本発明の抗M E T抗体の、重鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、軽鎖またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列、またはその両方をコードするヌクレオチド配列を含み得る。好ましい態様では、トランスジェニック動物は、ヒトM E Tに特異的に結合する、重鎖および軽鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含み、発現する。抗M E T抗体または部分は、任意のトランスジェニック動物において作製することができる。好ましい態様において、非ヒト動物は、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマである。非ヒトトランスジェニック動物は、例えば、血液、乳汁、尿、唾液、涙、粘液および他の体液中に該コード化されたポリペプチドを発現することができる。

10

【0218】

医薬組成物

20

本発明の別の面は、本発明の抗M E T抗体またはその抗原結合部分または抗M E T抗体組成物を有効成分として（または、唯一の有効成分として）含む医薬組成物である。かかる医薬組成物は、任意の本明細書に記載の抗M E T抗体組成物または抗体またはその抗原結合部分を含み得る。ある態様において、組成物は、M E T介在性障害（例えば、M E Tの過剰発現により特徴付けられる障害）および/または癌の改善、予防および/または処置を目的とする。任意の態様において、組成物は、非小細胞肺癌、胃癌、肝細胞癌、食道癌、結腸直腸癌、乳頭状腎細胞癌、神経膠芽腫、腎細胞癌、前立腺癌、および/または副腎皮質癌の改善、予防、および/または処置を目的とする。

【0219】

一般に、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤（複数可）と共に製剤として投与されるのに適している。用語“賦形剤”は、本発明の化合物以外の任意の成分を記載するために本明細書中で使用される。賦形剤（複数可）の選択は、特定の投与様式、溶解性および安定性に対する賦形剤の影響、ならびに剤形の性質などの要因に依存する。本明細書で用いる、“薬学的に許容される賦形剤”には、生理学的に適合性である任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に許容される賦形剤の一例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、ならびにそれらの組み合わせがある。多くの場合、例えば、組成物中にマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムなどの、糖類、ポリアルコールなどの等張剤を含むことが好ましい。薬学的に許容される物質のさらなる例は、湿潤剤、および抗体の貯蔵寿命または有効性を向上させる湿潤剤または乳化剤、防腐剤または緩衝剤などの少量の補助物質である。

30

40

【0220】

本発明の医薬組成物およびその製造方法は、当業者には容易に明らかであろう。このような組成物およびそれらの製造方法は、例えば、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company, 1995)に見いだされ得る。医薬組成物は、好ましくは、G M P（適正製造基準）条件下で製造される。

【0221】

本発明の医薬組成物は、単一単位用量として、または単一の単位用量を複数として、バルクで調製、包装、または販売され得る。本明細書で用いる“単位用量”は、所定量の活

50

性成分を含む医薬組成物の個別の量である。活性成分の量は、対象に投与される有効成分の投与量にほぼ等しいか、またはそのような投与量の好都合な一部、例えば、半分または3分の1のような用量である。

【0222】

当技術分野で許容されるペプチド、タンパク質または抗体を投与するための任意の方法は、本発明の抗体および抗原結合部分に適切に使用することができる。

【0223】

本発明の医薬組成物は、一般的に、非経腸投与に適する。本明細書で用いる、医薬組成物の“非経腸投与”には、対象の組織の物理的なブリーチングおよび組織内のブリーチ（breach）を経て医薬組成物を投与することにより、一般的に直接投与で、血流、筋肉内、または内臓へ投与することにより特徴づけられる任意の投与経路が含まれる。従って、非経腸投与は、組成物の注射による、外科的切開を介して組成物を適用することによる、組織貫通非外科的創傷を通しての組成物の適用などによる、医薬組成物の投与を含むが、これらに限定されない。特に、非経腸投与は、皮下、腹腔内、筋肉内、胸骨内、静脈内、動脈内、髄腔内、脳室内、尿道内、頭蓋内、滑液嚢内注射または注入；および、腎臓透析注入技術が含まれるように意図されるが、これらに限定されない。局所灌流もまた意図される。好ましい態様には、静脈内および皮下経路が含まれる。

【0224】

非経腸投与に適する医薬組成物の製剤は、一般的に、滅菌水または滅菌等張生理食塩水などの薬学的に許容される担体と組み合わせた有効成分を含む。このような製剤は、ボーラス投与または連続投与に適した形態で調製、包装または販売され得る。注射用製剤は、例えばアンプルまたは防腐剤を含む多用量容器のように、単位投与量形態で調製、包装、または販売され得る。非経腸投与のための製剤としては、油性または水性ビークル、ペーストなどの、懸濁液、溶液、エマルジョンが含まれるが、これらに限定されない。かかる製剤はさらに、懸濁剤、安定剤、または分散剤を含むが、これらに限定されない、1以上の追加の成分を含んでもよい。非経腸投与のための製剤の一態様において、有効成分は、再構成される組成物の非経腸投与前に適切なビークル（例えば、発熱物質を含まない滅菌水）で再構成するための乾燥（すなわち、粉末または顆粒）形態で提供される。非経腸製剤はまた、塩、炭水化物および緩衝剤などの賦形剤を含有してもよい水溶液（好ましくはpH3から9）を含むが、いくつかの用途のために、それらがより適切に無菌の非水性溶液として製剤され得るか、または無菌の、発熱物質を含まない水などの適切なビークルと共に使用される乾燥形態として製剤され得る。非経腸投与形態の例としては、溶液または懸濁液の無菌水溶液中、例えば、水性プロピレングリコールまたはデキストロース溶液が挙げられる。所望であれば、このような投与量形態は、適切に緩衝され得る。有用である他の非経腸的に投与可能な製剤には、微結晶形態の有効成分を含むもの、またはリポソーム調製物中に有効成分を含むものが含まれる。非経腸投与のための製剤は、即時型および/または変更型の放出がなされるように製剤することができる。変更型放出製剤には、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的指向性放出、およびプログラム放出が含まれる。

【0225】

例えば、一面において、無菌の注射用溶液は、上記に列挙した成分の1つまたは組み合わせとともに適切な溶媒中に必要量で、抗M E T抗体またはその抗原結合部分または抗M E T抗体組成物を組み込み、必要に応じて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本的な分散媒体および上記に列挙したものから必要な他の成分を含む滅菌ビークル中に有効化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、有効成分の粉末に加えて、予め濾過滅菌したその溶液からの任意のさらなる所望の成分を生じる、真空乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、また、分散液の場合には必要とされる粒度を維持することによって、また、界面活性剤を使用することによって、維持することができる。注射可能な組成物の持続的吸収は、その組

10

20

30

40

50

成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩やゼラチンを含めることによって、および/または放出調節コーティング（例えば、徐放性コーティング）を用いることによって行うことができる。

【0226】

本発明の抗体はまた、鼻腔内にまたは吸入によって投与することができ、一般的には、乾燥粉末吸入器から乾燥粉末の形態（混合物として、単独で、または混合成分粒子として、例えば、好適な薬学的に許容される賦形剤と混合した形態）で、適切な噴射剤を使用してまたは使用せずに、経鼻などの加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー（好ましくは微細な霧を生成するために電気流体力学を用いるアトマイザー）、または適切な噴射剤を使用しもしくは使用しないネブライザーとして、または、点鼻液として投与され得る。

10

【0227】

加圧容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー、またはネブライザーは、一般的に、例えば、分散、可溶化または有効成分の放出を延長するのに好適な薬剤、溶媒としての噴射剤（複数可）を含む、本発明の抗体の溶液または懸濁液を含む。

【0228】

乾燥粉末または懸濁液製剤における使用に先立って、薬剤製品は、一般的に、吸入による送達に適した大きさ（一般的には5ミクロン未満）に微粉化される。これは、スパイラルジェットミリング、流動床ジェットミリング、ナノ粒子を形成するための超臨界流体プロセス、高圧均質化、または噴霧乾燥などの任意の適切な粉碎方法によって行うことができる。

20

【0229】

インヘイラーまたはインサフレーター（例えば、ゼラチンまたはHPMC製）において使用するためのカプセル剤、プリスター剤およびカートリッジ剤は、本発明の化合物、適切な粉末ベースおよび動作調整剤の粉末ミックスを含有するように製剤化することができる。

【0230】

細かい霧を発生するための電気流体力学を用いるアトマイザーにおいて使用するのに適している溶液製剤は、1動作につき好適な用量の本発明の抗体を含有することができ、動作容積は、1 μ lから100 μ lまで変化させ得る。

【0231】

吸入/鼻腔内投与を目的とする本発明の製剤には、メントールおよびレボメントールなどの適当な香味剤、またはサッカリンもしくはサッカリンナトリウムなどの甘味剤を添加することができる。

30

【0232】

吸入/鼻腔内投与のための製剤は、即時型放出および/または調節型放出であるように製剤化することができる。放出調節製剤には、遅延放出、持続放出、パルス放出、制御放出、標的放出およびプログラム放出が含まれる。

【0233】

乾燥粉末吸入器およびエアロゾルの場合に、投与量単位は、計量された量を送達するバルブによって決定される。本発明による単位は、一般的には、本発明の抗体の計量された用量、または“一吹き（puff）”を投与するように設計される。全体の1日用量は、一般的には単回用量で投与されるか、またはより通常には、1日を通して分割用量として投与される。

40

【0234】

本発明の抗体および抗体部分はまた、経口投与用に製剤され得る。経口投与は、化合物が胃腸管に入るような嚥下を、かつ/または化合物が口から直接、血流に入る頬、舌または舌下投与を含んでもよい。

【0235】

経口投与に適している製剤には、錠剤などの固体、半固体および液体系；多成分粒子もしくはナノ粒子、液体または粉末を含有する軟質または硬質カプセル；ロゼンジ（液体充

50

填を包含) ; チューイング剤 ; ゲル ; 急速分解投与形態 ; フィルム ; 卵形剤 ; スプレー ; ならびに類 / 粘膜接着パッチが包含される。液体製剤には、懸濁剤、液剤、シロップおよびエリキシルが包含される。

【0236】

液体製剤には、懸濁剤、液剤、シロップおよびエリキシルが包含される。このような製剤を、軟質または硬質カプセル(例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース製)中の充填剤として使用することもでき、一般的には、担体、例えば水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、メチルセルロースまたは適切なオイルならびに1種または複数の乳化剤および/または懸濁化剤を含む。液体製剤はまた、固体、例えばサシェからの再構成により調製することもできる。

10

【0237】

免疫複合体

本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分の治療的使用のための別のオプションは、免疫複合体の形態であり、すなわち、抗体またはその抗原結合部分と、抗がん剤などの1つまたは複数の薬剤の複合体である。2以上の抗MET抗体を含む本発明の組成物は、免疫複合体の形態で単一の抗体を含んでもよく、またはそれらは、免疫複合体の形態で2以上の抗体を含んでいてよい。

【0238】

細胞毒性物質(例えば、従来の化学療法剤および他の小分子抗癌剤)、サイトカイン(この場合、コンジュゲートは“イムノサイトカイン”と称し得る)、毒素(この場合、コンジュゲートを“免疫毒素”と称し得る)および放射性核種などを含む様々な種類の抗癌剤を、本発明の抗体に結合させることができる。少数の免疫複合体は既に臨床使用に関して承認されている。これらには、Zevalin(登録商標)(^{90}Y に結合したマウス抗CD20抗体)、Bexxar(登録商標)(^{131}I に結合したマウス抗CD20抗体)およびMylotarg(登録商標)(カリケアマイシンに結合したヒト化抗CD33抗体)が含まれる。臨床試験で検討されている他の免疫複合体には、例えばドキシソルピシンまたはメイタンシノイド化合物に結合した抗体が含まれる。臨床試験で検討されている免疫毒素には、切頭型シュードモナス外毒素Aに結合したいくつかの抗体が含まれる。IL-2に結合したヒト化EpCAM抗体を含む免疫サイトカインも試験されている。

20

【0239】

細胞毒性剤に結合させた本発明の抗体の場合、これらは、例えば、アルキル化剤(例えばカルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン)、代謝拮抗剤(例えばメトトレキサート、カペシタピン、ゲムシタピン)、アントラサイクリン(例えばブレオマイシン、ドキシソルピシン、マイトマイシンC)ならびに植物アルカロイド(例えばドセタキセルおよびパクリタキセルなどのタキサン類、ならびにビンブラスチン、ピンクリスチンおよびビノレルピンなどのビンカアルカロイド類)を含む、化学療法剤の主要なクラスのいずれかに属し得る。免疫複合体の使用は、抗癌剤を腫瘍に特異的に向かわせるため、本発明の抗体に基づく免疫複合体は、有利には、カリケアマイシンもしくはメイタンシン誘導体などの高度細胞毒性剤、または細菌毒素(例えばシュードモナス外毒素A、ジフテリア毒素)もしくは植物毒素(例えばリシン)などの毒素に基づき得る。

30

40

【0240】

免疫複合体中の結合した抗癌剤は、一般に、血清中では比較的安定であるが、免疫複合体が標的細胞内にインターナライズされたときに薬物の放出を可能にする、不安定なリンカーによって抗体に連結される。好適なリンカーとしては、例えば、血清中の中性pHでは安定であるが、インターナライゼーション後にリソソーム内の弱酸性条件下で酸加水分解を受ける化学的リンカー、細胞内チオールによって切断されるジスルフィドリンカー、および血清中で安定であるが、細胞内区画では酵素切断を受けるペプチドリンカーが挙げられる。

【0241】

種々の結合方法が、本発明の2またはそれ以上の抗体を含む組成物において想定され得

50

る。例えば、2つの抗体に関しては、抗体を2もしくはそれ以上の異なる抗癌剤に結合するか、または一方の抗体を、他方の抗体に結合した酵素などの作用物質によって活性化されるプロドラッグに結合することが可能である。抗体指向性酵素プロドラッグ療法 (ADEPT) の一般的な概念が、モノクローナル抗体に関して記載されており、ここでは、mAB-酵素複合体により腫瘍に対して標的化された酵素によってプロドラッグが活性化されるが、本発明は、この方法を特定の条件に適合させる可能性を提供し得る。故に、正常組織への損傷を回避または低減しつつ、腫瘍細胞の死滅を特異的に増大させることが可能であり得る。

【0242】

抗癌性免疫複合体に関するさらなる情報については、Wu et al., Nature Biotechnology 23(9):1137-1146 (2005); Schrama et al., Nature Reviews/Drug Discovery 5:147-159 (2006); and Rohrer, Chimica Oggi/Chemistry Today 27(5):56-60 (2009)を参照のこと。

【0243】

本発明の抗体および組成物の治療的使用

一面において、本発明の抗MET抗体およびその抗原結合部分および抗MET組成物は、MET介在性障害の処置に使用される。ある態様において、MET介在性障害とは、METの過剰発現により特徴付けられる状態である。任意の態様において、医薬組成物は、癌、例えば、非小細胞肺癌、胃癌、肝細胞癌、食道癌、結腸直腸癌、乳頭状腎細胞癌、グリヤ芽腫、副腎皮質癌、腎細胞癌、前立腺癌、およびMETを発現するかもしくは過剰発現するかまたはMET経路活性化に依存する他の癌の処置に使用するためのものである。

【0244】

ある面において、抗体または抗体組成物は、異常なMETの過剰活性によって特徴付けられる、癌などの疾患を治療するために使用される。ある態様において、異常な過剰活性は、遺伝子増幅、タンパク質の過剰発現、MET活性化遺伝子変異 (例えば、点突然変異または異常な遺伝子スプライシング事象)、またはHGFの過剰発現から生じる。

【0245】

特定の面において、本発明の抗MET抗体およびその抗原結合部分および抗MET組成物は、別のチロシンキナーゼ受容体を標的とする薬剤による治療に耐性である患者を治療するために使用することができる。ある態様において、患者は、ErbBキナーゼ阻害剤による治療に耐性である。任意の態様において、ErbBキナーゼ阻害剤は、EGFR、ErbB2、ErbB3またはErbB4を標的とする。特定の態様において、ErbBキナーゼ阻害剤は、EGFRを標的とする。別の態様では、ErbBキナーゼ阻害剤は、HER3を標的とする。ErbBキナーゼ阻害剤、例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パンティヌムマブ (pantimumab)、トラスツマブ、またはそれらの任意の組合せから選択され得る。

【0246】

“処置する (treat)”、“処置 (treating)” および “処置 (treatment)” は、生物学的障害および/またはその付随する症状の少なくとも1つを緩和または抑止する方法を意味する。本明細書で用いる、疾患、障害または病状の“軽減”は、疾患、障害、または病状の症状の重症度および/または発生頻度を低下させることを意味する。さらに、本明細書の“処置 (treatment)”への言及は、治療的、緩和的および予防的治療への言及を含む。

【0247】

一面において、処置の対象、または患者は、哺乳動物、好ましくはヒト対象である。該対象は、男性または女性のいずれであっても、いかなる年齢であってもよい。

【0248】

“治療的有効量”とは、治療される障害の症状の1以上をある程度に軽減するとき、投与される治療薬の量を意味する。

【0249】

本発明の治療用組成物中の個々の抗体の間の比、または同時に投与される本発明の個々

10

20

30

40

50

の抗体の場合には、連続的にまたは別々に、多くの場合、抗体は等量で投与されるが、必ずしもそうである必要はない。したがって、2つの抗M E T抗体またはその抗原結合部分を含む本発明の組成物は、多くの場合約1 : 1の比でそれらを含み得るが、個々の抗体の特性に応じて、抗体またはその部分の非均等量で使用することが望ましい。例えば、2つの抗体組成物中の別の抗体またはその部分に対する1つの抗体またはその部分の割合は、例えば、5から95%の間、10から90%の間、20から80%の間、30から70%の間、40から60%の間、または45から55%の間である。

【0250】

本発明の抗体組成物または抗体または抗原結合部分は、単独で、または1以上の他の薬物もしくは抗体（またはそれらの任意の組み合わせなど）と組み合わせて投与され得る。したがって、以下に詳述するように、本発明の医薬組成物、方法および使用はまた、他の活性剤との組み合わせ（同時投与）の態様を包含する。

【0251】

1またはそれ以上の他の治療剤とその抗体組成物および抗体および抗原結合部分を参照して、本明細書で用いる用語“共投与（co-administration）”および“併用投与”は、以下を意味し、包含することを意図する：

- 処置を必要とする患者への、本発明の抗体組成物 / 抗体 / 抗原結合部分および治療剤（複数可）のこのような組み合わせの同時投与であって、かかる成分が単一剤形に共に製剤されるとき、該患者に実質的に同時に該成分が放出される、
- 処置を必要とする患者への、本発明の抗体組成物 / 抗体 / 抗原結合部分および治療剤（複数可）のこのような組み合わせの実質的同時投与であって、かかる成分が互いに別個の剤形に分離して製剤されるとき、該患者に実質的に同時に投与されることにより、該患者に実質的に同時に該成分が放出される、
- 処置を必要とする患者への、本発明の抗体組成物 / 抗体 / 抗原結合部分および治療剤（複数可）のこのような組み合わせの連続投与であって、かかる成分が互いに別個の剤形に分離して製剤されるとき、各投与間に有意な時間間隔で該患者に連続で投与されることにより、該患者に実質的に異なる時間に該成分が放出される；および、
- 処置を必要とする患者への、本発明の抗体組成物 / 抗体 / 抗原結合部分および治療剤（複数可）のこのような組み合わせの連続投与であって、かかる成分が単一剤形に共に製剤されるとき、該成分が制御された様式で放出されることにより、それらが該患者に同時に、連続して、ならびに / または同時におよび / または異なる時間に重複して放出されて、各部分が同一または異なる経路のいずれかによって投与され得る。

【0252】

本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分は、独立型療法として、すなわち、追加の治療的処置なしで投与され得る。あるいは、本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分を用いた治療は、少なくとも一つの追加の治療的処置（併用療法）を含んでよい。ある態様において、抗体組成物または抗体またはその抗原結合部分は同時投与され得るか、または癌を治療するための別の薬物 / 薬物と共に製剤され得る。類かの治療的処置は、例えば、化学療法剤、抗腫瘍剤、または抗血管形成剤、別の抗癌抗体、および / または放射線療法を含み得る。

【0253】

本発明の抗体組成物、抗体、または抗原結合部分と癌細胞の最終分化を誘導することが知られている薬剤との組合せにより、効果をさらに向上させることができます。そのような化合物は、例えば、レチノイン酸、trans-レチノイン酸、cis-レチノイン酸、フェニル酪酸、神経増殖因子、ジメチルスルホキシド、活性型ビタミンD3、ベルオキシソーム増殖剤活性化受容体ガンマ、12-O-テトラデカノイルホルボール13-アセテート、ヘキサメチレン-ビス-アセトアミド、トランスフォーミング増殖因子-ベータ、酪酸、サイクリックAMP、およびベスナリノンからなる群より選択され得る。ある態様において、化合物は、レチノイン酸、フェニル酪酸、オールトランスレチノイン酸および活性型ビタミンDからなる群より選択される。

【 0 2 5 4 】

本発明の抗 M E T 抗体組成物または抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分および少なくとも 1 種の他の薬剤を含む医薬品は、癌療法において、同時、個別または連続投与のための併用処置として使用され得る。化学療法化合物としては、問題の特定の癌の処置に適する任意の化学療法剤、例えば、アルキル化剤、例えばシスプラチン、カルボプラチンおよび/またはオキサリプラチンなどの白金誘導体；植物アルカロイド(alkoid)、例えばパクリタキセル、ドセタキセルおよび/またはイリノテカン；抗腫瘍抗生物質、例えばドキソルピシン(アドリアマイシン)、ダウノルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン、ダクチノマイシン、プレオマイシン、アクチノマイシン、ルテオマイシン(luteomycin)および/またはマイトマイシン；トポテカンなどのトポイソメラーゼ阻害剤；

ならびに/または、代謝拮抗剤、例えばフルオロウラシルおよび/または他のフルオロピリミジンからなる群より選択される薬物であり得る。

10

【 0 2 5 5 】

また、本発明の抗 M E T 抗体またはその抗原結合部分または抗 M E T 抗体組成物は、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)に関連する補助療法において使用され得ることも考えられる。これらは、受容体の細胞内チロシンキナーゼドメインと相互作用し、細胞内 M g - A T P 部位に関して競合することによりリガンド誘導性受容体リン酸化を阻害する、合成の、主にキナゾリン由来の低分子量分子である。従って、本発明の抗体組成物および M E T を標的とする少なくとも 1 種の T K I を含む医薬品は、癌療法における同時、別個または連続投与のための併用処置としても使用され得る。

20

【 0 2 5 6 】

任意の面において、本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分は、M E T または H G F を標的とし得る、M E T 経路の別の阻害剤と併用投与され得る。ある態様において、該阻害剤は、A M G 1 0 2、A M G 2 0 8、A M G 4 5 8、A R Q 1 9 7、A V 2 9 9、B A Y - 8 5 3 4 7 4、C G E N 2 4 1、D N 3 0、E 7 0 5 0、E M D 1 2 0 4 8 3 1、E M D 1 2 1 4 0 6 3、I N C B 2 8 0 6 0、J N J 3 8 8 7 7 6 0 5、K 2 5 2 a、L Y - 2 8 7 5 3 5 8、M G C D 2 6 5、M K - 2 4 6 1、M P - 4 7 0、N K 4、O A - 5 D 5、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、P F - 0 4 2 1 7 9 0 3、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、P H A - 6 6 5 7 5 2、S G X - 5 2 3、S U 5 4 1 6、S U 1 1 2 7 4、T A K 7 0 1、X L 1 8 4、X L 8 8 0、カボザンチニブ、クリゾチニブ、フィクラツズマブ、フェレチニブ(foretinib)、ゴルバチニブ(golvatinib)、オナルツズマブ(onartuzumab)、リロツムマブ(rilotumumab)、およびチバンチニブからなる群から選択されるが、これらに限定されない。

30

【 0 2 5 7 】

ある態様において、本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分は、E r b B 阻害剤(例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ)またはヒートショックプロテイン 9 0 (h s p 9 0) 阻害剤(例えば、17-AAG)と併用投与され得る。

【 0 2 5 8 】

他の態様において、本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分は、例えば V E G F に対する抗体(例えば、A v a s t i n (登録商標))と組み合わせて使用し得る。さらに他の態様では、本発明の抗体組成物は、免疫系の細胞を刺激することが知られている薬物と組み合わせて使用してもよく、そのような併用処置は、本発明の抗体組成物の効果の免疫介在性増強をもたらす。そのような免疫刺激剤の例としては、組換えインターロイキン(例えば I L - 2 1 および I L - 2) が挙げられる。

40

【 0 2 5 9 】

本発明の抗体組成物および抗体およびその抗原結合部分は、上記の通り治療法に使用することができ、上記の通り治療に使用するためのものであってよく、および/または、上記の通り治療のための薬剤の製造における使用のためのものであってよいことが理解される。

【 0 2 6 0 】

50

用量および投与経路

本発明の抗体組成物は、問題の病状の処置に有効な量で、すなわち所望の結果を達成するのに必要な投与量および期間で投与され得る。治療的有效量は、処置される特定の病状、患者の年齢、性別および体重などの因子、ならびに抗体が単独処置として投与されるか、または1もしくはそれ以上の付加的な抗癌処置剤と組み合わせて投与されるかによって異なり得る。

【0261】

投与量レジメンは、最適な所望の治療応答を提供するために調整され得る。例えば単回ボラスとして投与されるか、いくつかの分割用量を経時的に投与されるか、または治療対象の緊急性によって指示される投与量の減少または増加を伴って投与され得る。投与の容易さおよび投与量の均一性のために投与量単位形態で非経腸組成物を製剤することがとりわけ有利である。本明細書で用いる、投与量単位形態とは、治療される患者/対象のための単位投与量として適した物理的に別個の単位；必要な医薬担体と共に所望の治療効果を生じるように計算された所定量の有効化合物を含む各単位、を意味する。本発明の投与量単位形態の仕様は、一般的に、(a)化学療法剤の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果または予防効果、ならびに(b)個体における感受性の処置のためのそのような有効化合物の調合の技術分野に固有の制限に左右され、それらに直接依存する。

【0262】

従って、当業者は本明細書で提供される開示に基づいて、用量および投与レジメンが療法の技術分野において周知の方法に従って調整されることを理解しているであろう。すなわち、最大耐用量は容易に確立することができ、患者に検出可能な療法的利益をもたらす有効量も決定することができ、それぞれの薬剤を投与して検出可能な療法的利益を患者に提供するための時間的要件も決定することができる。従って、本明細書において特定の用量および投与レジメンが例示されるが、これらの例は本発明の実施において患者に提供することができる用量および投与計画を一切限定しない。

【0263】

投与量の値は緩和すべき病状のタイプおよび重篤度により様々であってよく、それには1回量または複数回用量が含まれてよいことは特記すべきである。さらに、あらゆる特定の対象に関して、具体的な投与量レジメンは個々の要求およびその組成物を投与する、またはその投与を監督する人の専門的な判断に従って時間の経過に伴って調整されるべきであること、ならびに本明細書に記載の投与量範囲は例示的なものでしかなく、特許請求される組成物の範囲または実用を制限することを意図していないことは理解されるべきである。さらに、本発明の組成物を用いる投与量レジメンは、疾患の種類、患者の年齢、体重、性別および医学的状態、病状の重篤度、投与経路、ならびに用いる特定の抗体を含む種々の要因に基づき得る。従って、投与量レジメンは広範に変化し得るが、標準的な方法を用いて常套的に決定することができる。例えば、用量は、薬物動態学的または薬力学的パラメータに基づいて調整されてよく、それには毒性作用および/または臨床検査値のような臨床作用が含まれ得る。従って、本発明は当業者により決定されるような患者内の用量の段階的増大を包含する。適切な投与量およびレジメンの決定は関連する技術分野において周知であり、当業者は一度本明細書で開示される教示を提供されればそれが包含されることを理解し得る。

【0264】

本発明の抗体組成物の好適な用量は、0.1~100mg/kg、例えば約0.5~50mg/kg、例えば約1~20mg/kgの範囲内であると考えられる。抗体組成物は、例えば、少なくとも0.25mg/kg、例えば少なくとも0.5mg/kg、例えば少なくとも1mg/kg、例えば少なくとも1.5mg/kg、例えば少なくとも2mg/kg、例えば少なくとも3mg/kg、例えば少なくとも4mg/kg、例えば少なくとも5mg/kg、および例えば最大50mg/kgまで、例えば最大30mg/kgまで、例えば最大20mg/kgまで、例えば最大15mg/kgまでの投与量で投与され得る。投与は、通常は好適な間隔で、例えば週に1回、2週間に1回、3週間に1回、ま

10

20

30

40

50

たは4週間に1回、担当医師が適切と判断する期間に亘って繰り返され、担当医師は場合により必要に応じて用量を増加または減少させ得る。

【0265】

腫瘍治療のための有効量は、患者において疾患の進行を安定化させる、および/または症状を改善する、好ましくは、例えば腫瘍サイズを縮小することによって、疾患の進行を止めるその能力によって測定され得る。癌を阻害する本発明の抗体または組成物の能力は、例えば実施例に記載の通り、インビトロアッセイによって、ならびにヒト腫瘍における効果を予測する好適な動物モデルにおいて評価され得る。好適な投与量レジメンは、個々の特定状況において最適の治療応答を提供するために選択され、例えば単回ボラスとしてまたは持続点滴として、および場合によりそれぞれの症例の緊急性によって指示される投与量の調整を伴って投与される。

10

【0266】

診断的使用および組成物

本発明の抗体はまた、診断的方法において有用である(例えば、インビトロ、エキソビボ)。例えば、抗体は、患者からのサンプル(例えば、組織サンプル、または炎症性滲出液、血液、血清、腸液、唾液、もしくは尿のような体液サンプル)中のMETのレベルを検出および/または測定するために使用可能である。好適な検出および測定方法としては、フローサイトメトリー、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、化学発光分析法、放射免疫測定法、および免疫組織学のような免疫学的方法が挙げられる。本発明はさらに、本明細書に記載の抗体を含む複数部分のキット(例えば、診断用キット)を包含する。

20

【0267】

本発明をよりよく理解するために、以下の実施例を記載する。これらの実施例は、例示のみの目的であり、いかなる方法においても本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0268】

本明細書中に記載される全ての文献、特許および特許出願は、引用により本明細書中に包含される。上記の発明は理解を明確にする目的のために例示および実施例によっていくらか詳細に説明してきたが、本発明の教示を考慮して当業者に容易に明らかなように、特定の変更および修正が、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、本発明の範囲内において行われ得る。

30

【実施例】

【0269】

実施例

実施例1：抗MET抗体のクローニング

抗MET抗体は、WO2005/042774に記載の通り、本質的にSymplex(商標)を用いて得た。簡潔には、BALB/c、C57およびC3Hマウスを、METを過剰発現するヒト癌細胞株(HCT-116)、組換えヒトMETタンパク質(Sino Biologicals)、リガンド(HGF)と予めインキュベートした組換えヒトMETタンパク質、またはトリプシン消化したMETを用いて隔週で免疫化した。脾臓および鼠径リンパ節から得られたマウス血漿細胞をFACSで選別し、VHおよびVLをコードする配列の連鎖は、選別された血漿細胞上で遂行され、一段階の多重オーバーラップ・エクステンションRT-PCR、その後のネステッドPCRに基づく二段階PCR手順を利用して、配列の同族の対合を促進させた。同族のVHおよびVL配列の連鎖のための原理は、WO2005/042774およびMeijer et al., J Mol Biol 358(3):764-72 (2006)に記載されている。

40

【0270】

METに対する結合特異性を有する抗体を同定するために、上記で得られたVHおよびVLをコードする配列を、全長の抗体として発現させた。これは、WO2012/059858に記載の方法を用いて、発現ベクターにVHおよびVLをコードする対のレポーターを挿入し、そして宿主細胞にトランスフェクションすることを含む。

50

【0271】

産生された抗体の特異性は、METタンパク質の細胞外ドメインまたはヒト免疫グロブリンFcドメインに翻訳的に融合したMETタンパク質の細胞外ドメインの何れかを抗原として用いてELISAにより決定した。Nunc MaxiSorpプレート（カタログ番号464718）を、4℃で一晩、PBS中に希釈した1μg/mlの組換えMETタンパク質でコーティングした。プレートを、50μlの2%ミルク-PBS-Tでブロッキングする前に、PBS+0.05% Tween 20（PBS-T）で1回洗浄した。プレートをPBS-Tで再度洗浄し、次いで、20μlの2%ミルク-PBS-Tで洗浄した。FreeStyle 293トランスフェクタントからの上清10μlを添加し、室温で1時間インキュベートし、その後、プレートをPBS-Tで1回洗浄した。2% 10
ミルク-PBS-Tで1:25000希釈した二次抗体（HRP-ヤギ抗ヒト 軽鎖、Serotec社、カタログ番号STAR 100P）を、ウェルに結合した抗体を検出するために添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-Tで1回洗浄し、次いで、25μlの基質（Kem-En-Tec Diagnostics、カタログ番号4518）を添加し、5分間インキュベーションした。インキュベーション後に25μlの1M硫酸を添加して反応を停止した。特異的シグナルを450nmでELISAリーダー上で検出した。ELISAデータから、陽性の抗体クローンを同定し、配列分析およびMETへの結合の検証のために選択した。

【0272】

実施例2：機能的抗MET抗体混合物のスクリーニング

本実施例は、リード候補を同定するための、METを標的とするキメラモノクローナル抗体およびこれらのモノクローナル抗体の混合物のインビトロでの試験を記載する。モノクローナル抗体および混合物は、癌細胞株EBC1、MKN45、OE33およびSNU5の増殖を阻害する能力について評価した。

【0273】

方法

ヒトのMETを標的とするマウス由来の抗体を、ヒト癌細胞株のインビトロでの増殖を阻害するそれらの能力についてアッセイした。モノクローナル抗体および2-抗体混合物（2つのモノクローナル抗体の1:1混合物）を、2% FBSおよび1% P/Sを添加したRPMI 1640グルタマックス培地中、100μg/mlの最終総抗体濃度に希釈して、5μg/mlの終濃度を得た。その後、適切な数の細胞（EBC1:1500細胞/ウェル、MKN45:2000細胞/ウェル、OE33 4300細胞/ウェルおよびSNU5:800細胞/ウェル）を、384ウェルプレート中の試験プレートに添加し、抗体と共に、加湿インキュベーター中で37℃にて4日インキュベートした。その後、WST-1試薬をプレートに添加し、37℃で1時間インキュベートした。吸光度を、ELISAリーダーを用いて、450nmおよび620nm（基準波長）で測定した。620nmでの吸光度を450nmでの吸光度から差し引いた。代謝活性細胞（MAC）の量を、以下のように未処理対照の割合として計算した：

【化1】

$$\%MAC = \left(\frac{(OD_{\text{実験}} - OD_{\text{培地}})}{(OD_{\text{未処理}} - OD_{\text{培地}})} \right) \times 100$$

代謝活性は生存細胞の数と相関し、より低い%MACは抗体によるより高いレベルの細胞増殖阻害に対応することを意味すると考えられる。

【0274】

結果

抗体混合物は、癌細胞株のパネル間の細胞増殖を阻害するそれらの能力に基づいてランク付けした。細胞株EBC1、MKN45、OE33およびSNU5の代謝活性に対するモノクローナル抗体および2つの抗体の混合物の生存率の結果を、表3に示す。7つの異

なる混合物が、平均50%未満に代謝活性を阻害する。

【0275】

最も効果的な混合物のうち、2つの抗体9006および9338の組み合わせが、広範な細胞増殖阻害活性を示した。興味深いことに、各抗体単独は、組み合わせよりも低い効果を示し、2つの抗体が相乗的に作用し得ることが示唆された。9006 + 9338に加えて、他の高度に効果的な混合物としては、9206 + 9232、8955 + 9338、9206 + 9338、9006 + 9232、8955 + 9006、8955 + 9096および8955 + 9232が挙げられることが表3から分かる。さらに、これらの上から8つの混合物が、比較的少数の個々のモノクローナル抗体、特に8955、9006、9232、9338および9206に基づいていることは明らかである。

【0276】

【表3】

表3. モノクローナル抗体および抗体混合物の抗増殖効果

mAbまたはmAb混合物	mAbまたはmAb混合物で処理した細胞の代謝活性（未処理対照の%）						
	配列クラスター（複数可）	SNU5	OE33	MKN45	EBC1	平均	ランク
9206 + 9232	008 + 007	32	70	32	37	43	1
9006 + 9338	018 + 004	33	54	31	54	43	2
8955 + 9338	029 + 004	33	60	24	63	45	3
9206 + 9338	008 + 004	39	52	34	55	45	4
9006 + 9232	018 + 007	36	72	24	59	48	5
8955 + 9006	029 + 018	46	62	25	61	48	6
8955 + 9096	029 + 018	55	41	40	59	49	7
8955 + 9232	029 + 007	46	66	25	69	51	8
9206 + 9217	008 + 012	35	60	54	99	62	9
8955 + 9206	029 + 008	39	71	57	82	62	10
9044 + 9111	011 + 009	47	77	37	91	63	11
9111 + 9217	009 + 012	40	101	24	93	64	12
9111 + 9232	009 + 007	67	83	53	63	66	13
9006 + 9111	018 + 009	31	101	36	98	66	14
9111 + 9206	009 + 008	39	79	53	96	67	15
9006 + 9154	018 + 009	34	91	49	98	68	16
9096 + 9232	018 + 007	50	79	54	94	69	17
9184 + 9217	009 + 012	45	103	30	101	70	18
9184 + 9206	009 + 008	30	88	63	97	70	19
9173 + 9232	028 + 007	51	90	84	57	71	20
9006 + 9184	018 + 009	35	105	44	107	73	21
9154 + 9217	009 + 012	52	98	36	105	73	22
9212 + 9232	025 + 007	57	92	90	64	76	23
9154 + 9206	009 + 008	48	66	87	103	76	24
9096 + 9184	018 + 009	47	80	71	108	76	25
9096 + 9111	018 + 009	43	107	65	94	77	26

10

20

30

40

【化 2】

9173 + 9340	028 + 072	40	98	79	98	79	27
9044 + 9184	011 + 009	57	104	54	102	79	28
9184 + 9232	009 + 007	92	100	62	63	79	29
9111 + 9173	009 + 028	47	103	69	103	80	30
9111 + 9133	009 + 028	54	103	64	106	82	31
9006 + 9122	018 + 031	46	112	50	118	82	32
9096 + 9338	018 + 004	50	57	100	120	82	33
9173	028	38	99	83	108	82	34
9006 + 9146	018 + 036	61	75	79	118	83	35
9146 + 9173	036 + 028	48	115	66	105	83	36
9173 + 9184	028 + 009	44	113	70	108	84	37
8820 + 9006	044 + 018	55	103	65	115	85	38
9044 + 9154	011 + 009	59	100	67	113	85	39
8908 + 9006	032 + 018	42	110	50	138	85	40
9173 + 9206	028 + 008	47	107	74	112	85	41
9173 + 9212	028 + 025	46	99	93	102	85	42
9133 + 9232	028 + 007	77	110	88	66	85	43
9044 + 9206	011 + 008	89	65	83	107	86	44
9146 + 9232	036 + 007	105	90	86	65	86	45
8955 + 9111	029 + 009	73	96	61	117	87	46
9006 + 9173	018 + 028	43	109	84	113	87	47
9154 + 9173	009 + 028	55	104	79	112	88	48
9154 + 9232	009 + 007	94	115	73	70	88	49
9006 + 9212	018 + 025	61	79	94	120	88	50
9096 + 9154	018 + 009	73	82	83	115	88	51
9006	018	68	73	90	122	88	52
9122 + 9206	031 + 008	67	110	56	125	89	53
8820 + 8955	044 + 029	87	87	80	106	90	54
8908 + 9217	032 + 012	74	96	65	125	90	55
9006 + 9096	018 + 018	68	71	90	131	90	56
9133 + 9212	028 + 025	59	96	102	104	90	57
9122 + 9232	031 + 007	117	86	95	62	90	58
9006 + 9133	018 + 028	58	111	81	113	90	59
8955 + 9007	029 + 046	83	81	98	100	91	60
8908 + 8955	032 + 029	79	70	87	128	91	61
9096 + 9173	018 + 028	39	119	88	117	91	62
9133 + 9173	028 + 028	45	102	116	102	91	63
9217 + 9232	012 + 007	114	100	82	68	91	64
8955 + 9146	029 + 036	83	72	92	118	91	65
9122 + 9217	031 + 012	65	126	46	128	91	66
8955 + 9154	029 + 009	80	80	85	122	92	67

10

20

30

40

【化 3】

9133 + 9184	028 + 009	58	112	85	111	92	68
9006 + 9044	018 + 011	66	75	91	135	92	69
8955 + 8958	029 + 029	72	94	81	121	92	70
8820 + 9111	044 + 009	61	135	53	120	92	71
8955 + 9122	029 + 031	69	91	81	129	93	72
9096 + 9133	018 + 028	57	99	95	120	93	73
9006 + 9217	018 + 012	67	93	92	120	93	74
9111 + 9122	009 + 031	98	106	50	118	93	75
9146 + 9184	036 + 009	89	93	81	110	93	76
9212 + 9340	025 + 072	69	117	86	99	93	77
8820 + 9232	044 + 007	88	103	75	108	93	78
9146 + 9206	036 + 008	79	75	101	119	94	79
9044 + 9122	011 + 031	80	109	63	124	94	80
9006 + 9340	018 + 072	70	78	101	127	94	81
9173 + 9338	028 + 004	61	102	92	120	94	82
8820 + 9184	044 + 009	67	121	60	128	94	83
9006 + 9206	018 + 008	81	78	101	117	94	84
9173 + 9217	028 + 012	58	124	72	123	94	85
9133 + 9206	028 + 008	67	102	95	112	94	86
9006 + 9007	018 + 046	61	92	81	142	94	87
9212	025	86	90	101	100	94	88
9232 + 9338	007 + 004	86	93	77	122	94	89
9133	028	68	102	99	109	95	90
8820 + 9206	044 + 008	58	129	69	123	95	91
8955 + 9340	029 + 072	81	70	97	133	95	92
9111 + 9146	009 + 036	93	108	74	109	96	93
9096 + 9206	018 + 008	70	79	98	138	96	94
9133 + 9146	028 + 036	67	100	112	106	96	95
9096 + 9122	018 + 031	49	121	77	139	96	96
8906 + 9232	056 + 007	89	111	74	112	97	97
9133 + 9340	028 + 072	69	123	93	101	97	98
8908 + 9232	032 + 007	95	100	76	116	97	99
8955 + 9184	029 + 009	74	96	87	130	97	100
9044 + 9232	011 + 007	85	112	82	110	97	101
8955 + 9212	029 + 025	105	75	91	118	97	102
8899 + 8955	029 + 029	78	77	97	137	97	103

10

20

30

40

【化 4】

9111 + 9212	009 + 025	89	91	101	109	97	104
8820 + 9173	044 + 028	46	158	77	112	98	105
9096 + 9146	018 + 036	81	78	101	133	98	106
9096 + 9212	018 + 025	83	86	98	127	98	107
8955 + 9133	029 + 028	85	96	89	126	99	108
9212 + 9338	025 + 004	66	118	93	119	99	109
8820 + 9338	044 + 004	90	96	91	119	99	110
8906 + 9217	056 + 012	82	106	81	128	99	111
9206	008	90	86	97	125	99	112
8955 + 9173	029 + 028	69	113	94	123	100	113
9007 + 9232	046 + 007	109	99	77	114	100	114
8908 + 9111	032 + 009	93	114	79	114	100	115
9111 + 9184	009 + 009	88	99	100	115	100	116
9007 + 9217	046 + 012	89	97	90	126	100	117
8955	029	100	68	101	132	100	118
9154 + 9184	009 + 009	90	102	91	119	101	119
9122 + 9173	031 + 028	75	131	80	116	101	120
8820 + 9096	044 + 018	82	95	86	140	101	121
9111 + 9154	009 + 009	93	103	91	117	101	122
9096 + 9340	018 + 072	80	81	105	139	101	123
8908 + 9206	032 + 008	90	108	80	127	101	124
9206 + 9212	008 + 025	91	77	114	124	101	125
8820 + 9122	044 + 031	63	158	61	125	102	126
9146	036	119	92	100	100	103	127
9206 + 9340	008 + 072	103	94	94	120	103	128
8906 + 9006	056 + 018	66	142	52	152	103	129
8820 + 9133	044 + 028	63	152	80	116	103	130
8902 + 8955	029 + 029	72	87	105	149	103	131
9232 + 9340	007 + 072	115	93	85	120	103	132
8955 + 9026	029 + 029	91	75	101	146	104	133
9146 + 9212	036 + 025	110	93	106	106	104	134
9111	009	97	96	102	119	104	135
8955 + 9217	029 + 012	94	97	91	134	104	136
8820 + 9154	044 + 009	72	148	73	123	104	137
8906 + 9206	056 + 008	90	126	75	127	104	138
8820 + 9217	044 + 012	91	151	65	112	105	139
9044 + 9217	011 + 012	103	102	93	120	105	140
9232	007	115	100	84	121	105	141
9340	072	113	99	95	114	105	142
9217 + 9338	012 + 004	83	124	89	126	106	143

10

20

30

40

【化5】

9096	018	90	86	103	144	106	144
9184 + 9212	009 + 025	98	103	108	114	106	145
9007 + 9173	046 + 028	67	153	95	109	106	146
8908 + 9184	032 + 009	85	127	90	123	106	147
9111 + 9340	009 + 072	107	109	101	111	107	148
9044 + 9133	011 + 028	91	132	87	119	107	149
9133 + 9154	028 + 009	90	123	101	117	108	150
8820 + 9044	044 + 011	97	138	79	117	108	151
8820 + 9212	044 + 025	82	143	87	119	108	152
9122 + 9184	031 + 009	96	140	73	124	108	153
9007 + 9206	046 + 008	89	113	95	136	108	154
9184	009	101	110	101	123	109	155
9338	004	100	98	96	141	109	156
8906 + 9111	056 + 009	112	120	84	122	110	157
9111 + 9338	009 + 004	107	121	90	121	110	158
9146 + 9340	036 + 072	112	137	90	100	110	159
9133 + 9338	028 + 004	89	133	96	120	110	160
8820 + 8906	044 + 056	86	148	80	126	110	161
9217	012	96	108	100	135	110	162
9044 + 9338	011 + 004	101	101	103	135	110	163
8908 + 9154	032 + 009	98	132	87	124	110	164
9007 + 9096	046 + 018	88	96	96	160	110	165
9212 + 9217	025 + 012	80	121	111	129	110	166
9044 + 9173	011 + 028	72	150	95	126	111	167
9007 + 9154	046 + 009	100	135	83	126	111	168
9154 + 9340	009 + 072	113	117	85	131	111	169
9338 + 9340	004 + 072	103	106	103	134	112	170
9096 + 9217	018 + 012	106	108	96	137	112	171
9007 + 9184	046 + 009	85	137	95	131	112	172
9007 + 9340	046 + 072	109	112	95	133	112	173
9044 + 9340	011 + 072	92	120	100	138	113	174
9184 + 9340	009 + 072	109	132	99	110	113	175
9122 + 9133	031 + 028	92	133	105	124	113	176
8955 + 9044	029 + 011	102	100	102	151	114	177
8906 + 9044	056 + 011	96	122	86	151	114	178
9007 + 9122	046 + 031	108	135	85	127	114	179
8820 + 9146	044 + 036	101	153	84	119	114	180
8908 + 9122	032 + 031	131	132	76	117	114	181
8906 + 9133	056 + 028	92	155	92	118	114	182
8908 + 9133	032 + 028	95	158	96	110	115	183

10

20

30

40

【化 6】

8908 + 9096	032 + 018	85	117	88	169	115	184
9217 + 9340	012 + 072	106	137	87	129	115	185
9133 + 9217	028 + 012	99	135	98	127	115	186
8906 + 9173	056 + 028	72	185	79	122	115	187
9007 + 9146	046 + 036	108	146	79	127	115	188
8906 + 9184	056 + 009	105	147	81	128	115	189
9007 + 9111	046 + 009	108	138	86	129	115	190
8908 + 9173	032 + 028	85	170	90	118	116	191
8908 + 9044	032 + 011	87	135	81	159	116	192
9044 + 9146	011 + 036	119	129	93	122	116	193
8908 + 9212	032 + 025	120	125	95	123	116	194
9007 + 9212	046 + 025	115	127	93	128	116	195
9044 + 9212	011 + 025	133	117	96	118	116	196
8820 + 9007	044 + 046	96	152	84	134	117	197
9044	011	115	118	98	137	117	198
8906 + 9122	056 + 031	122	148	78	120	117	199
8908 + 9340	032 + 072	106	128	94	141	117	200
9184 + 9338	009 + 004	124	129	92	126	118	201
8906 + 9154	056 + 009	119	144	79	128	118	202
9007 + 9044	046 + 011	112	129	87	145	118	203
8906 + 9212	056 + 025	133	136	86	120	119	204
9146 + 9338	036 + 004	135	126	91	123	119	205
8908 + 9338	032 + 004	106	129	101	139	119	206
9007 + 9338	046 + 004	96	136	101	144	119	207
9154	009	123	119	97	138	119	208
9122 + 9338	031 + 004	129	123	99	126	119	209
8820 + 8908	044 + 032	110	154	83	131	119	210
8820	044	111	157	88	121	119	211
9007 + 9133	046 + 028	92	166	101	119	120	212
9146 + 9217	036 + 012	123	128	104	126	120	213
9122 + 9154	031 + 009	112	151	88	129	120	214
8906 + 9096	056 + 018	93	127	86	176	120	215
8906 + 9146	056 + 036	102	176	83	121	121	216
9154 + 9212	009 + 025	135	111	110	128	121	217
8908 + 9146	032 + 036	126	150	90	121	122	218
8906 + 9340	056 + 072	106	157	95	129	122	219
9146 + 9154	036 + 009	116	130	111	132	122	220
9154 + 9338	009 + 004	137	128	88	139	123	221
8820 + 9340	044 + 072	113	143	96	140	123	222

10

20

30

40

【化7】

9007	046	122	141	94	139	124	223
8906 + 8908	056 + 032	93	147	98	157	124	224
9122 + 9212	031 + 025	130	138	110	123	125	225
8908	032	135	134	96	140	126	226
8906 + 9338	056 + 004	119	166	93	129	127	227
9122 + 9146	031 + 036	146	128	109	128	128	228
8906	056	127	153	95	136	128	229
8906 + 9007	056 + 046	84	157	100	172	128	230
9044 + 9096	011 + 018	124	138	98	155	129	231
9122	031	142	134	106	136	130	232
9122 + 9340	031 + 072	146	150	98	125	130	233
8908 + 9007	032 + 046	109	152	101	169	133	234
8906 + 8955	056 + 029	136	167	99	150	138	235

10

【0277】

実施例3：9006および9338抗体のヒト化

本実施例は、9006および9338抗体のマウス抗体フレームワーク領域のヒト化について記載する。抗体のヒト化は、親の非ヒト抗体の特異性および親和性を保持しながら、ヒトに適用したとき、最小限の免疫原性を有する分子を作製するために実施される。

20

【0278】

方法

9006および9338抗体のヒト化を、“CDR移植”アプローチを用いて行った。まず初めに、元のマウス生殖細胞系遺伝子を、マウス生殖細胞系VおよびJ遺伝子データベースに対して9006(図26)および9338(図27)のV遺伝子配列をブラスト検索することによって同定した。これは、最も近いマウス生殖細胞系遺伝子は、9006のアミノ酸配列の可変重鎖および可変軽鎖遺伝子についてIGHV9-1*02/IGHJ4*01およびIGKV8-28*01/IGKJ2*01であることを示唆した。同様に、最も近いマウス生殖細胞系遺伝子は、9338のアミノ酸配列の可変重鎖および可変軽鎖遺伝子についてIGHV1-4*01/IGHJ3*01およびIGKV4-79*01/IGKJ4*01であった。第二に、抗体VHおよびVL遺伝子を、抗体の機能および/または構造において役割を果たし得るフレームワーク領域内の体細胞突然変異を同定するために、マウス生殖細胞系に対してアラインさせた。このような残基は、所謂“復帰突然変異”残基として最終ヒト化抗体遺伝子に含まれ得る。その後、9006および9338の可変抗体配列をヒト免疫グロブリンデータベースに対してブラスト検索して、そのフレームワーク領域が抗体のヒト化のために使用され得る最も近いヒト生殖細胞系を同定した。抗体9006について、保持されたヒト生殖細胞系は、可変重鎖および可変軽鎖遺伝子のそれぞれについてIGHV7-4-1*02/IGHJ6*01およびIGKV4-1*01/IGKJ2*01であった。抗体9338について、保持されたヒト生殖細胞系は、可変重鎖および可変軽鎖遺伝子のそれぞれについてIGHV1-69*08/IGHJ1*01およびIGKV3-11*01/IGKJ2*01であった。最後に、各抗体について、キメラ抗体由来のCDR領域を、選択したヒトフレームワークおよびJ遺伝子セグメント中に移植した。CDR配列をIMGT(登録商標)に従って定義づけた。

30

40

【0279】

結果

最終的なヒト化9006および9338抗体配列を、それぞれ図28および図29に示す。

【0280】

50

実施例 4：抗 M E T 対照抗体類縁体のクローニング

本実施例は、アミノ酸配列の供給源および抗 M E T 対照抗体の類縁体の作製に使用される最終的な抗体フォーマットを示す。列挙された抗体のいくつかは、広範囲に特徴付けられ、明確に定義されたエピトープを有している。数多くの抗体が臨床評価に入っている。

【 0 2 8 1 】

方法

表 4 の抗体類縁体の可変重鎖および軽鎖ドメインをコードするアミノ酸配列を、列挙された特許または特許出願から得た。タンパク質配列は、ヒトのコドン対比表を用いて D N A 配列に逆変換した。対応する D N A 配列を遺伝子合成し、完全長抗体の発現をもたらす、一定のヒト重鎖または軽鎖ドメインを含有する発現ベクターにクローニングした。唯一の例外は、F a b 断片として発現させた 5 D 5 抗体である。発現のために選択したヒト抗体アイソタイプは、適用可能な F c 領域に導入された追加の突然変異と共に抗体フォーマットカラムに表示される。C H O 細胞を、標準的なハイブリドーマ培養技術を用いて増殖させた、ハイブリドーマクローン H B - 1 2 0 9 3 を除いて、標準的なタンパク質発現システムを使用して、対応する発現プラスミドでトランスフェクトした。対応する抗体上清を、標準的なプロテイン A 精製カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

【 0 2 8 2 】

【表 4】

表 4. 遺伝子合成抗体類縁体および対応する抗体フォーマットのリスト

抗体クローン	検察コード	抗体フォーマット	参照
224G11	ABT-700、h224G11	組み換え I g G 1	EP2014681A1
223C4	N.A.	組み換え I g G 1	EP2014681A1
C8-H241	LY2875358、LA480、emibetuzumab	組み換え I g G 4 (S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A)	WO2010059654A1
36C4	ARGX-111	組み換え I g G 1	US2012/0148607A1
5D5	OA-5D5、MetMAb、オナルツズマブ	組み換え I g G 1 F a b	US 7476724 B2
13-MET	N.A.	組み換え I g G 1	WO2009/142738 A2
28-MET	N.A.	組み換え I g G 1	WO2009/142738 A2
HB-12093	N.A.	マウスハイブリド ーマ	EP 0922102

【 0 2 8 3 】

実施例 5：M E T 抗体のエピトープビニング (epitope binning)

本実施例は、M E T 抗体がペアごとの競合パターンに基づくエピトープビン(bin)にグループ分けを示す。異なるエピトープビンに属する抗体は M E T 細胞外ドメイン (E C D) 上の異なるエピトープを認識する。

【 0 2 8 4 】

方法

ペアごとの抗体競合の調査を、O c t e t Q K 3 8 4 機器 (Fortebio, USA) を用いてバイオレイヤー干渉法 (BioLayer Interferometry: BLI) 分析によって行った。市販のヒト M E T F c 融合タンパク質 (R&D Systems) を、抗ヒト F c センサーチップ (Fortebio, USA) およびハーセプチン陰性対照抗体でブロックした残余の抗 F c 部位上に捕捉した。抗原コーティングされた表面を、80 μg / ml の抗 M E T 抗体濃度で飽和させ、その後、競合結合試験でペアごとの抗 M E T 抗体の組み合わせを評価した。センサー表面を 10 mM グリシン - H C l (p H 1 . 5) と共にインキュベーションして再生し、新たな競合サイクルに再利用した。

【0285】

結果

13個の試験したMET抗体の競合パターンを図1に示す。MET抗体は、12の異なるエピトープピンのグループに分かれることが見いだされた。抗体Hu9006は、C8-H241と重複する異なるエピトープに結合することが見いだされた。しかしながら、C8-H241も、Hu9338および36C4によって阻止されたが、Hu9006は阻止されなかったため、エピトープはC8-H241とは異なっていた。その結果、Hu9006およびC8-H241は、異なるエピトープピンに割り当てられた。Hu9338のエピトープは、36C4と重複し、両抗体は、試験したパネル内の他の抗体と同一の競合パターンを示し、これらは結果的に同じエピトープピンに割り当てられた。

10

【0286】

抗体224G11、28-MET、5D5、9206および13-METは、いくつかの例では単一方向の阻害を示した。この観察された現象は、アロステリック効果によって引き起こされる可能性があり、繰り返し競合実験で観察された。

【0287】

実施例6：HGFリガンド遮断活性についてのMET抗体の分析

本実施例は、抗MET抗体のパネルが、バイオレイヤー干渉法分析を用いて競合アッセイを行うことにより、HGFリガンド遮断活性について分析された方法を示す。

【0288】

方法

HGFリガンド遮断活性の検討を、Octet QK384機器 (Fortebio, USA) を用いて、バイオレイヤー干渉法 (BioLayer Interferometry: BLI) 分析によって行った。市販のヒトMET Fc融合タンパク質 (R&D Systems) を、抗ヒトFcセンサーチップ (Fortebio, USA) およびハーセプチン陰性対照抗体でブロックした残余の抗Fc部位上に捕捉した。次に、抗原コーティングされた表面を、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ (533 nM) の抗MET抗体濃度 (5D5 Fab断片は、 $26.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ (533 nM) に希釈された) で飽和させた。その後、抗体でMETを飽和した後、HGFリガンド遮断活性を、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ (222 nM) で試験したヒトHGFリガンド (R&D Systems) と共にインキュベートすることにより評価した。ハーセプチンIgG1を陰性対照抗体として使用した。

20

30

【0289】

結果

競合分析の結果を以下の表5に示す。抗体Hu9006およびHu9338は両方とも、HGFリガンド結合を約80%阻害することが見いだされたが、5D5 Fabは、HGF結合を完全に (100%) 阻害することが見いだされた。等モル濃度のHu9006およびHu9338を混合したとき ($80 \mu\text{g}/\text{ml}$ の総濃度、 533 nM)、HGFリガンド結合は、約90%阻害された。この結果、より効率的なHGFリガンド遮断活性は、抗体Hu9006とHu9338を1:1で混合することにより得られた。抗体C8-H241および36C4は、HGFリガンド結合をそれぞれ約80%および75%阻害することが見いだされたが、抗体13-METおよび28-METは、HGF結合をそれぞれ約80%および50%阻害した。アゴニスト作用を示す抗体5882および陰性対照抗体ハーセプチンは、HGF結合を阻害しなかった (3-7%のHGF結合阻害)。

40

【0290】

【表5】

表5. MET抗体飽和後のHGF結合阻害

抗体	%HGF結合阻害
Hu9006	78
Hu9338	81
5882	3
Hu9006+Hu9338	89
C8-H241	81
36C4	74
224G11	20
223C4	69
13-MET	81
28-MET	50
HB-12093	9
5D5 Fab	100
12398	84
9206	62
ハーセプチン	6

10

20

【0291】

実施例7：抗MET抗体のエピトープマッピング

本実施例は、本発明のMET抗体の結合エピトープが、細胞上に発現されたキメラMET構築物への結合を分析することにより、SEMA - ドメイン中のブレード (blade) 2または3にマッピングされた方法を示す。本実施例はまた、本発明の抗体のエピトープが、試験した対照抗体類縁体と如何に異なるかを示す。

【0292】

方法

ヒトMET受容体は、907アミノ酸 (残基25 - 932) の細胞外ドメインからなる。該細胞外ドメインは、以下のアミノ酸配列によって定義された、SEMAドメイン (残基27 - 515)、システインに富むプレキシンセマフォリンインテグリンドメイン (PSIドメイン、残基520 - 561) および4つの免疫グロブリン様ドメインに細分され得る。IPT1: AA563 - 655。IPT2: AA657 - 739。IPT3: AA742 - 836。IPT4: AA837 - 932。ドメインの定義は、Gherardi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(21):12039-44 (2003) および Uniprot entry P08581に記載されている。SEMAドメインは、7枚の羽根のプロペラ構造に折り畳まれた7つのシート (ブレード) からなる (Stamos J. et al., EMBO J. 23:2325-2335. (2004))。フリン切断部位は、 および 鎖にSEMAドメインを分割する、位置307 - 308に存在する。SEMA - ドメインは、ブレード1 - 4から構成されるアミノ酸残基27 - 307によりコード化され、SEMA - ドメインは、ブレード5 - 7から構成されるアミノ酸残基308 - 515によりコード化される。SEMA - ドメインは、HGFリガンドの 鎖のための結合部位を含むが、HGF 鎖のMET結合部位は、含まないままである (Merchant et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 110(32):E2987-96 (2013))。僅かに1個のレポートが、MET ECDのIPT3およびIPT4ドメインもまた、高親和性HGF結合を仲介することを報告している (Basilico et al., J Biol Chem. 283(30):21267-21277 (2008))。

30

40

【0293】

ヒトMETアイソフォーム1のmRNA配列は、NCBIからダウンロードした (受託番号NM_000245.2; アミノ酸配列は配列番号: 1に示されている)。ヒトME

50

Tはまた、19アミノ酸(STWWKEPLNIVSFLFCFAS(配列番号:2))が、IPTドメイン3のS755に置換される、異なるアイソフォーム(アイソフォーム2)に存在する。リーダーペプチド配列を含むアイソフォーム2のアミノ酸配列は、配列番号:2に記載されている。完全長ニワトリおよびマウスMETタンパク質配列は、NCBIからダウンロードした(それぞれ、受託番号NP_990543(配列番号:3)およびNP_032617(配列番号:4))。各ドメインまたはサブドメインを順次ニワトリのDNA配列で置換した、細胞外ドメイン(ECD)のキメラヒト/ニワトリドメイン交換変異体は、完全なヒト、マウスまたはニワトリMET ECD遺伝子と共に合成された遺伝子であった。SEMAドメインの7つのブレードの各々が順次ヒトからマウス配列に交換されたキメラ構築物もまた合成した。

10

【0294】

ブレード結合特異性を決定するために使用される構築物は、以下の通りであった(数字は、マウス配列に交換された配列を言う):マウスブレード1:AA25-83。マウスブレード1-2:AA25-162。マウスブレード1-3:AA25-233。マウスブレード1-4:AA25-295。マウスブレード1-5:AA25-430。マウスブレード1-6:AA25-479。マウスブレード1-7:AA25-513。逆の構築物もまた作製した。マウスPSI-IPT4:(AA515-932)。マウスブレード7-IPT4:(AA480-932)。マウスブレード6-IPT4:(AA431-932)。マウスブレード5b-IPT4:(AA382-932)。マウスブレード5a-IPT4:(AA293-932)。マウスブレード4-IPT4:(AA234-932)。マウスブレード3-IPT4:(AA163-932)。マウスブレード2-IPT4:(AA84-932)。ブレード1-4は、SEMA-サブドメインに位置し、ブレード5-7は、SEMA-サブドメインに位置した。

20

【0295】

最近、ラマ(Llama)配列がMET SEMAドメインのヒト配列と交換された他のキメラ構築物が報告された(Basilico C. et al. J. Clin Invest. 124:3172-3186 (2014))。これらの構築物は、ラマMET配列が一般に利用できなかったため、マウス配列がラマ配列の代わりに挿入された修飾を有する以外、同様に合成された。追加のキメラタンパク質の配列の定義は以下の通りである(AA番号は、マウス配列に交換された配列を言う):LS1:AA25-122、LS2:AA25-224、LS3:AA25-312、LS4:AA25-371、LS5:AA25-473。SEMA-サブドメイン中のLS1-3残基およびSEMA-サブドメイン中のLS4-6。最後に、SEMA-サブドメインにおけるヒトMET ECD配列の15AAが順次マウス配列に交換された構築物を、直鎖状エピトープのより詳細なマッピングのために合成した。構築物109-120について、11アミノ酸のみをマウス配列に交換した。各構築物は、2アミノ酸が重複するように設計され、15AAまでの置換を有する全22種の構築物が、ブレード1(AA89-313)の後にヒトMET SEMA-サブドメイン配列を含むように作製された。

30

【0296】

上記のすべての合成キメラまたは野生型構築物を、SV5ペプチドタグ、グリシンセリンリンカーおよび目的の遺伝子にこのカセットをC末端融合させた結果生じたグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーのコーディング配列を含む発現ベクター中にサブクローニングした(Bouquin T. et al., J. Biotechnol. 125:516-528 (2006))。作製した発現構築物を、HEK293細胞の一時的FreeStyle(商標)トランスフェクションに使用し、産生された融合タンパク質を、GPIアンカーを介して細胞膜に標的化した。MET抗体を、iQue(登録商標)スクリーナー(IntelliCyt corporation)を用いるフローサイトメトリーによりトランスフェクト細胞への結合について分析した。抗体は、50µg/mlから始めて3倍希釈を用いて8点の滴定実験で試験し、抗ヒトIgG(H+L)Alexa Fluor(登録商標)647色素を用いて検出した。MET構築物の発現レベルを、ピオチニル化抗SV5mAb MCA1360Bによりモニ

40

50

ターし、ストレプトアビジン APC Cy7 で検出した。陰性対照ニワトリまたはマウス MET 構築物について 50 µg/ml で試験した全ての抗体の平均蛍光として定義されたカットオフ値 + 4 つの標準偏差値を、ドメイン交換またはブレード交換構築物に対する特異的結合からバックグラウンド結合を識別するために使用した。単一のアミノ酸または 15 アミノ酸がマウス配列に交換された構築物と結合する抗体は、変異が SEMA - サブドメインに位置し、そして SEMA - サブドメインに対して指向性の 5D5 の結合に影響を与えないことが示されたため、3 µg/ml で試験した 5D5 結合に対して正規化された。

【0297】

結果

野生型およびキメラのヒト、ニワトリまたはマウス MET ECD コンストラクトの表面発現レベルを、SV5 染色で評価した。すべての評価した構築物は十分に発現され、ニワトリ SEMA - サブドメインを含む構築物を除いて、SV5 抗体で染色することができた。構築物に結合する各 MET 抗体の力価を評価した（データは示していない）。異なる試験をしたキメラ構築物に結合する抗体のまとめを図 2 に示す。SEMA - サブドメイン中の 15 AA セグメントが順次マウスに交換されている、ヒト MET ECD 構築物に対する抗体結合の差のまとめを表 6 に示し、SEMA - サブドメイン中の表面に露出した残基がマウス配列に変異されたヒト MET ECD 構築物に対する抗体結合の差のまとめを表 7 に示す。最後に、すべてのエピトープ所見のまとめを表 8 に示す。

【0298】

5D5 および 224G11 を除く、全ての試験した抗体は、SEMA - サブドメインに結合することが見いだされた。

【0299】

SEMA - ドメインに変異を導入するキメラ構築物を用いる詳細なエピトープマッピングは、配列セグメント AA99 - 113 がマウスに交換されたとき、Hu9338 が、結合の有意な減少（5D5 と比べて 36% の結合）によって示されるようにブレード 2 に位置する直鎖状エピトープに結合することを示した（表 6）。Hu9338 のためのエピトープは別にあり、試験した MET パネル内の他の抗体で見いだされなかった。Hu9006 は、単一アミノ酸が点変異した MET 構築物またはマウス MET 配列の 15 AA の挿入を有する MET 構築物はいずれも、完全なヒト MET ECD と比べて、hu9006 の顕著に異なる結合を示さなかった。その結果、hu9006 のエピトープは、抗 MET 抗体パネルの他のメンバーと比べて異なっていた。Hu9338 および Hu9006 がそれぞれブレード 2 および 3 に位置するエピトープに結合するという発見は、これらの抗体が非競合的であり、かつ異なるエピトープピンに属することと矛盾しない。

【0300】

アゴニスト作用を示す抗体 5882 はまた、ブレード 3（AA163 - 224）に結合することが見いだされたが、位置 F206、D208、H209 および P210 の接触残基がマウス配列と交換されたとき、これらの位置で 5D5 と比較して少なくとも 50% 以下の結合であることが明らかにされた。重要なことに、これらの近接する位置の変異が、パネル内の他の抗体の結合に影響を及ぼさず、5882 の強力なアゴニスト活性が、これらの 4 つの置換によって定義された領域の結合に関連していることが示された。

【0301】

C8 - H241 抗体は、ブレード 2 および 3 の両方に位置するエピトープに結合することが見いだされた。ブレード交換構築物は、この抗体がブレード 3（AA163 - 224）中の重要なエピトープに結合することを示したが、さらに、ブレード 2 中の 15 AA（AA119 - 133）または 24 AA ブレード 3（AA209 - 233）がマウス配列に交換されたとき、構築物への結合の低下が観察されたことにより（5D5 と比べてそれぞれ 68 - 30% の結合）、エピトープの改良（refinement）が得られ得る。最後に、5D5 と比較して 19% のみの結合が得られたブレード 3 中で同定された接触残基（K223）は、C8 - H241 抗体のコアエピトープがブレード 3 に位置することを示した。こ

10

20

30

40

50

の結果は、HD交換質量分析により決定されたC8-H241の直鎖状エピトープが、位置123-128、144-156、192-195および220-227に存在したことを示し、先に報告されたデータ(Liu L. et al., Clin. 癌. Res. 20:6059-6070 (2014))とよく一致した。

【0302】

最後に、本発明者らは、より詳細に36C4のエピトープをマッピングすることができた。Basilioら(Basilico C. et al. J. Clin Invest. 124:3172-3186 (2014))は、ブレード2および3に存在すべき36C4のエピトープ(AA98-199)を記載するが、本発明者らは、特異性を、ブレード2中の位置129-143の直鎖状エピトープ(5D5と比較して58%の結合)と、ブレード3中の位置H209の接触残基(5D5と比較して43%の結合)に分けることができることを示した。位置H209の接触残基はまた、アゴニスト作用を示す5882抗体と共有されるが、5882はまた接触残基が結合する位置に近接する3つの他の位置にも結合するため、アゴニスト特性は明確に異なった。

10

【0303】

SEMAドメインに結合する5D5の結晶構造は、先に報告されており(Merchant M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:E2987-E2996 (2013))、試験により、5D5が、SEMAサブドメインの主にブレード5および6を認識したことが示されている。位置Q328、R331、L337およびN338の重要なアミノ酸残基がブレード5に存在し、これらの残基がマウス残基に改変されたとき、結合親和性が顕著に減少した。この結果は、本発明者らの結合分析と一致し、ブレード5中の重要なエピトープ(AA313-371)を認識することを明確に示している。

20

【0304】

本発明者らはまた、抗体224G11が、Basilioら(Basilico C. et al. J. Clin Invest. 124:3172-3186 (2014))によって提供された情報と一致して、ITP1ドメインを認識したことを見出した。

【0305】

【表6】

表6. SEMA-αドメインの15AAセグメントを順次マウスに交換したとき、HEK293細胞上に発現されたヒトMET ECD構築物への抗体の結合表6. SEMA-αドメインの15AAセグメントを順次マウスに交換したとき、HEK293細胞上に発現されたヒトMET ECD構築物への抗体の結合

30

構築物	Hu9338	Hu9006	C8-H241	36C4	5D5	セツキシマブ
MET 99-113	36	112	113	94	100	2
MET 119-133	131	88	68	107	100	2
MET 129-143	124	97	77	58	100	2
MET 209-223	133	114	57	96	100	2
MET 219-233	130	141	30	109	100	2
ヒト MET	144	137	135	162	100	1

抗体結合は、5D5結合の%として表される。灰色のセルは5D5と比較して70%未満の抗体結合であることを示す。

40

【0306】

【表 7】

表 7. SEMA- α ドメインの表面暴露残基をマウス残基に交換したとき、HEK293細胞上に発現されたヒトMET ECD構築物への抗体の結合

構築物	Hu9338	Hu9006	5882	C8-H241	36C4	5D5
F206P	127	96	31	103	104	100
D208G	75	69	39	95	71	100
H209Y	94	90	49	84	43	100
P210S	100	79	18	105	89	100
K223Q	198	112	96	19	127	100
ヒト MET	149	134	96	77	115	100

抗体結合は、5D5結合の%として表される。灰色のセルは5D5と比較して50%未満の抗体結合であることを示す。

【0307】

【表 8】

表 8. 変異MET構築物を発現する細胞表面を用いて試験したMET抗体について同定された結合エピトープのまとめ

抗体	ドメイン	SEM Aブレード	キメラ断片残基 (AA)	直線状エピトープ	接触残基	エピトープビン	HGFブロッキング
Hu9338	SEMA- α	2	AA 84-122	BL 2 A A 99-113	N.D.	Bin 8	あり
C8-H241	SEMA- α	2-3	AA 163-224	BL 2 A A 119-133 BL 3 A A 209-233	BL 3 K223	Bin 7	あり
36C4	SEMA- α	2-3	AA 84-224	BL 2:129-143	BL 3 H209	Bin 8	あり
Hu9006	SEMA- α	3	AA 163-224	N.D.	N.D.	Bin 6	あり
5882	SEMA- α	3	AA 163-224	N.D.	BL 3 F206、D208、H209、P210	Bin 9	なし
5D5	SEMA- α	5	AA 313-371	N.D.	N.D.	Bin 4	あり
224G11	IPT1	N.A.	AA 562-652	N.D.	N.D.	Bin 1	あり

略語：AA：アミノ酸配列。N. A：適用せず。N. D：結果が出ていない。BL：ブレード。

【0308】

実施例 8：キメラおよびヒト化抗MET抗体に対する親和性の測定

本実施例は、抗MET抗体9006および9338のヒト化変異体が、それらのキメラ対応物に匹敵する親和性を有することを示しており、該ヒト化抗体が、キメラ抗体の完全

な機能活性を有することを示唆している。さらに、該ヒト化抗MET抗体は、ヒトおよびカニクイザルMET ECDの両方に同等な結合を示す。

【0309】

方法

精製したヒト化およびキメラ9006および9338変異体の動態結合分析を、Octet QK384バイオレイヤー干渉法(BLI)バイオセンサー(Fortebio, USA)またはXPR-36表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサー(Bio-Rad, USA)上で実施した。

【0310】

Histagを付したヒトまたはカニクイザルMET ECD抗原を、Sinobiological(中国)から購入した。結合動態は、既報(Canziani et al., Anal Biochem 325(2):301-307 (2004))の通り、抗MET抗体を固定し、溶液中の一価MET抗原を保持することによって一価の抗原の条件下で測定した。可能な限り低い抗MET抗体濃度を、非特異的結合および物質移動限界を阻止するために適用した。Octetシステムにおいて抗体反応速度を測定するために、1.5 μg/mlの濃度の抗体を抗ヒトFcセンサー(Fortebio, USA)上に捕捉し、ヒトMET ECD抗原(100 nM)への結合について、を連続的に7回の2倍希釈により試験した。測定を、1000 rpmのプレート回転速度を用いて行い、センサーを再生し、1%BSAおよび0.001%Tween 20を含む、10 mMグリシン:HCl緩衝液(pH 1.5)またはPBS緩衝液に3回暴露する間の短い5秒間の交換によって再利用した。Bio-Rad XPR-36機器で行った表面プラズモン共鳴実験のために、抗MET抗体を0.25 - 0.5 μg/mlの濃度に調整し、モノクローナル抗ヒトFc抗体(Biacore, Denmark)を固定化することにより生成された抗ヒトIgG Fc表面上に捕捉した。抗MET抗体を、25 nMから1.56 nMまでの2倍の濃度範囲でヒトまたはカニクイザルMET ECDへの結合について試験し、その後、3 M MgCl₂再生バッファー(Biacore, Denmark)を用いて表面を再生した。記録された結合応答を、二重参照(double referencing)を使用して、結合速度定数(k_{on}またはk_a)、解離速度定数(k_{off}またはk_d)および親和性(KD)定数の計算のために単純ラングミュア1:1結合モデルに適合させた。

【0311】

結果

Octetのバイオセンサーを用いる動態測定により、3つの復帰突然変異を有する9006のヒト化変異体(Hu9006)および復帰突然変異を有さない9338のヒト化変異体(Hu9338)が、キメラ親抗体と比較してヒトMET抗原に対してわずかに改善された親和性を有することが示された(表9)。

【0312】

【表9】

表9. バイオレイヤー干渉法(BLI)によって測定される、ヒトMET ECDに対するキメラおよびヒト化MET抗体の結合反応速度

抗体	MET ECD	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	±	k _{on} Err or	k _{off} (s ⁻¹)	±	k _{off} Err or	KD (M)
9006	ヒト	5.4E+04	±	4.4E+02	1.2E-04	±	2.2E-06	2.2E-09
hu9006	ヒト	6.2E+04	±	6.8E+02	7.6E-05	±	3.1E-06	1.2E-09
9338	ヒト	1.9E+05	±	2.7E+03	1.1E-04	±	4.0E-06	6.0E-10
hu9338	ヒト	1.0E+05	±	2.0E+03	2.7E-05	±	3.6E-06	2.6E-10

【0313】

Bio-RadのXPR36 SPR機器を用いる反応速度測定により、Hu9006およびHu9338が、pM範囲の親和性でヒトおよびカニクイザルMET ECDの両方を認識することが示された(表10)。

【 0 3 1 4 】

【 表 1 0 】

表 1 0 . 表面プラズモン共鳴 (SPR) により測定される、ヒトまたはカニクイザル M E T E C D に対するヒト化 M E T 抗体の結合反応速度

抗体	MET E CD	kon (M ⁻¹ s ⁻¹)		kon Error	koff (s ⁻¹)		koff Error	KD (M)
hu9006	ヒト	1.9E+05	±	1.2E+03	1.1E-05	±	2.3E-07	5.5E-11
hu9006	カニクイザル	1.8E+05	±	1.5E+03	1.6E-05	±	2.9E-07	8.6E-11
hu9338	ヒト	4.7E+05	±	1.9E+02	6.3E-06	±	3.7E-07	1.4E-11
hu9338	カニクイザル	7.4E+05	±	2.2E+03	5.4E-05	±	3.6E-07	7.4E-11

10

【 0 3 1 5 】

実施例 9 : 抗 M E T 抗体を用いる M E T の分解

本実施例は、抗 M E T 抗体 9 0 0 6 および 9 3 3 8 が、単独でまたは組み合わせで、M E T の分解を誘導することを実証する。2 つの抗体の組合せは、何れかの抗体単独よりも有効に M E T 受容体の分解を誘導する。

【 0 3 1 6 】

方法

個々の抗 M E T 抗体 9 0 0 6 および 9 3 3 8、9 0 0 6 および 9 3 3 8 の混合物、ならびに C 8 - H 2 4 1 類縁体 (表 4 参照) により誘導される M E T 受容体の分解レベルを調べるために、ウェスタンブロット分析またはシンプルウェスタン分析を 2 4 または 4 8 時間の間、抗体で処理した S N U 5 細胞、E B C 1 細胞および M K N 4 5 細胞の全細胞溶解物に対して行った。要するに、T - 7 5 培養フラスコ中で増殖させ、5 0 % コンフルエントのときに培養培地を除去し、細胞を洗浄し、そして 2 0 μ g / m l の全抗体濃度の C 8 - H 2 4 1、9 0 0 6、9 3 3 8、9 3 3 8 + 9 0 0 6、または陰性対照抗体 (非哺乳動物標的に対するヒト I g G 1) の何れかで、2 4 時間または 4 8 時間、加湿インキュベーター中で 3 7 °C にて処理した。全細胞溶解物を、標準的な R I P A 緩衝液を用いて調製した。総タンパク質濃度を B C A アッセイを用いて決定し、1 - 1 0 μ g のタンパク質を、S a l l y 装置 (ProteinSimple) での単純ウェスタン自動化イムノアッセイによって、または M E T に対する一次検出抗体を用いたウェスタンブロット分析によって分析した。 - アクチンに対する抗体を、ウェスタンブロット分析のためのローディングコントロールとして用いた。

30

【 0 3 1 7 】

結果

ウェスタンブロット試験による結果 (図 3) は、個々の抗体 (とりわけ 9 0 0 6) での処理が、試験した全ての細胞株において M E T の分解を誘導することを示す。しかしながら、抗 M E T 抗体混合物 9 3 3 8 + 9 0 0 6 は、試験した全ての細胞株において個々の抗体 (9 0 0 6 または 9 3 3 8) と比較して増強された M E T 受容体の分解を誘導する。9 0 0 6 + 9 3 3 8 または C 8 - H 2 4 1 での処理の 2 4 時間後または 4 8 時間後の細胞 M E T 受容体レベルを、3 種の細胞株 S N U 5、E B C および M K N 4 5 における単純ウェスタン分析により比較した。図 4 に示された結果は、3 種全ての細胞株において 9 0 0 6 + 9 3 3 8 で処理した後に M E T 分解が増強されたことを実証する。

40

【 0 3 1 8 】

実施例 1 0 : 抗 M E T 抗体による M E T リン酸化および下流シグナル伝達の阻害

本実施例は、抗 M E T 抗体 9 0 0 6 および 9 3 3 8 が、M E T リン酸化および下流シグナル伝達 (p E R K 2 および p A K T のレベルによって決定される) に差異効果および細胞依存的効果を有することを実証する。抗 M E T 抗体混合物 9 0 0 6 + 9 3 3 8 は、M E

50

Tリン酸化および下流シグナル伝達の効率的阻害を誘導する。

【0319】

方法

抗MET抗体9006および9338ならびに抗MET抗体混合物9006+9338により誘導されるMETリン酸化および下流シグナル伝達の阻害レベルを調べるために、単純ウェスタン分析を、抗体で24時間処理したMKN45細胞およびEBC-1細胞の全細胞溶解物で実施した。細胞を、6ウェルプレート中で増殖させた。50%コンフルエントに達したとき、培養培地を除去し、そして細胞を1xPBSで洗浄して、20μg/mlの全抗体濃度の抗体(9006、9338、9006+9338、または陰性対照抗体Synagis(登録商標))で、24時間、加湿インキュベーター中で37℃にて処理した。全細胞溶解物を、標準的なRIPA緩衝液を用いて調製した。総タンパク質濃度をBCAアッセイを用いて決定し、約1mg/mlのタンパク質を、Sally装置(自動化サイズベースのイムノアッセイシステム、ProteinSimple)での単純ウェスタン自動化イムノアッセイによって、ならびにリン酸化MET(Tyr1234/1235およびTyr1349)、リン酸化ERK2(pERK2)、およびリン酸化AKT(pAKT)に対する一次抗体を用いて分析した。 -アクチンに対する抗体を、ローディングコントロールとして用いた(データは示さず)。

10

【0320】

結果

METのリン酸化レベル(図5)ならびにERK2およびAKTのリン酸化レベル(図6)の単純ウェスタン分析からの結果は、9006または9338単独での処理が、試験した細胞株におけるリン酸化に対する差異効果および細胞株依存的効果を誘導することを示す。しかしながら、抗MET抗体混合物9006+9338は、MKN45細胞およびEBC-1細胞の両方において、モノクローナル抗MET抗体9006または9338での処理と比較してMETリン酸化および下流シグナル伝達の効果的な阻害を誘導する。

20

【0321】

実施例11: 初代内皮細胞におけるキメラ抗MET抗体の抗増殖作用

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、感受性の血管モデルにおける生物学的効果を評価するのに適した初代内皮細胞である。抗MET抗体9006および9338ならびに抗体混合物9006+9338は、METリガンドHGFの不在下および存在下の両方で、HUVECの増殖を阻害し得ることが示された。

30

【0322】

材料および方法

皮膚線維芽細胞を解凍し、96ウェルプレート中の培養培地に播種した。室温で線維芽細胞の沈降後、GFP標識したHUVECのバイアルを解凍した。培養培地に再懸濁したHUVECを、線維芽細胞懸濁液の上部に添加し、37℃にて5%CO₂下、Incucyte装置(Essen Bioscience)中で一晚培養した。一晚のインキュベーション後、共培養細胞から培地を除去し、増殖培地で置き換え、さらに24時間インキュベートした。翌日、アッセイ培地を調製し、異なるリガンド/抗体混合物をアッセイ培地中に合わせ、混合した。増殖培地を除去し、抗体/リガンドの異なる組み合わせを含むアッセイ培地と交換した。培地を2~3日毎に抗体/リガンド混合物を含む新鮮なアッセイ培地と交換した。GFP-HUVECの写真を、4時間ごとに記録した。細胞数、細胞ネットワークの長さ、およびネットワーク分岐点の数を含むいくつかの細胞パラメータを、Incucyteソフトウェアを用いて分析した。

40

【0323】

結果

図7-11は、抗体9006および9338の初代内皮細胞増殖を特異的に阻害する効果を示し、対照的に、無関係の抗体対照はいかなる阻害効果も示さなかった。抗体混合物9006+9338は、特にHGFが培地中に存在するとき、HUVEC増殖の優れた阻害を示す。

50

【0324】

実施例12：キメラおよびヒト化抗MET抗体のインビトロでの比較

本実施例は、キメラ9006、キメラ9338およびキメラ9338+9006と、ヒト化変異体、すなわちヒト化9006(Hu9006)、ヒト化9338(Hu9338)およびヒト化9338+9006(Hu9338+Hu9006)とのインビトロでの比較を記載する。モノクローナル抗体および混合物を、数種の癌細胞株：Okajima、EBC1、MKN45、HCC827R1__cet#3、HCC827R1__cet#1およびKatoIIの増殖を阻害するその能力について評価した。

【0325】

方法

9006、9338、9338+9006(2つの成分の1:1混合物)、Hu9006、Hu9338およびHu9338+Hu9006(2つの成分の1:1混合物)と、陰性対照抗体(Synagis(登録商標))とを、2%FBSおよび1%P/Sを添加したRPMI1640グルタマックス培地中100μg/mlの最終総抗体濃度に希釈し、最高の抗体濃度を含む1ウェル当たり25μg/mlの終濃度を得た。その後、抗体を2倍の連続希釈を行い、17種までの異なる濃度を得た。関連する細胞の数(Okajima:1000細胞/ウェル、EBC1:750細胞/ウェル、MKN45:500細胞/ウェル、HCC827R1__cet#3:500細胞/ウェル、HCC827R1__cet#1:500細胞/ウェル;KatoII:750細胞/ウェル)を、384ウェルプレートにおける実験ウェルに添加し、抗体と共に4日間、加湿インキュベーター中で37にてインキュベートした。次いで、WST-1試薬をプレートに添加し、1時間、37にてインキュベートした。吸光度を、ELISAリーダーを用いて450nmおよび620nm(参照波長)で測定した。620nmでの吸光度を450nmでの吸光度から差し引き、代謝活性細胞(MAC)の量を、実施例2に記載の通り、未処理対照の%として計算した。

【0326】

結果

図12および13は、キメラおよびヒト化9006および9338抗体ならびにキメラおよびヒト化9006+9338抗体混合物の、細胞株HCC827R1__cet#3(12A)、HCC827R1__cet#1(12B)、MKN45(12C)、EBC-1(13A)、KatoII(13B)、およびOkajima(13C)に対する滴定からの生存率の結果を示す。Hu9006、Hu9338およびHu9338+Hu9006は、それらのキメラ対応物と同等の抗増殖作用を有することがグラフから明らかである。

【0327】

実施例13：ヒト化9338+9006および13-MET+28-METのインビトロでの比較

本実施例は、ヒト化9338+9006(Hu9338+Hu9006)、13-MET、28-METおよび13-MET+28-METのインビトロでの試験を記載する(表4参照)。モノクローナル抗体および混合物を、4種の癌細胞株：EBC1、MKN45、SNU5およびKatoIIの増殖を阻害するその能力について評価した。

【0328】

方法

抗体Hu9338+Hu9006(2つの成分の1:1混合物)、13-MET、28-METおよび13-MET+28-MET(2つの成分の1:1混合物)と、陰性対照抗体(Synagis(登録商標))とを、上記の通り、EBC1(500細胞/ウェル)、MKN45(750細胞/ウェル)、SNU5(750細胞/ウェル)およびKatoII(750細胞/ウェル)における抗代謝効果について試験した。

【0329】

結果

10

20

30

40

50

Hu9338 + Hu9006、13-MET、28-METおよび13-MET + 28-MET抗体の、細胞株EBC1、MKN45、SNU5およびKatoIIにおける滴定からの生存率の結果を図14に示す。抗MET抗体が、試験した細胞株によって異なるレベルの有効性および効能を有することが明らかになった。しかしながら、Hu9338およびHu9006の組み合わせは、試験したすべての細胞株において、13-MET、28-METおよび13-MET + 28-METと比較して代謝活性の優れた阻害を示す。

【0330】

実施例14：ヒトEBC-1腫瘍異種移植片モデルにおけるキメラ9006 + 9338抗体混合物のインビボでの有効性

10

本実施例は、ヒトMET増幅させた非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片における9006 + 9338抗体混合物のインビボでの有効性を実証する。

【0331】

方法

5×10^6 EBC-1細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。 120mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液(10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.0)、モノクローナル抗体9006、モノクローナル抗体9338、またはモノクローナル抗体9006 + 9338の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、50mg/kgの総抗体濃度で投与した。従って、9006処理および9338処理動物は、9006または9338のそれぞれを50mg/kgで投与し、一方、9006 + 9338で処理した動物は、25mg/kgの各抗体を含む混合物を投与した。

20

【0332】

結果

接種後10日目に、 120mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを8匹毎の4群に無作為化し、処理を開始した。図15に示すように、モノクローナル抗体9338による処理は、ピークル対照と比較して、動物における腫瘍増殖に影響を及ぼさなかった。対照的に、9006での処理は腫瘍増殖遅延をもたらし、一方、9006 + 9338での処理は、処理中の増殖の安定化をもたらし、このモデルにおけるすべての他の処理よりも優れていた。ピークル処理または9006もしくは9338単独処理の群の試験は、腫瘍過成長または腫瘍関連潰瘍により処理期間中に終了し、一方、9006 + 9338群の動物は、処理を完了し、処理終了後2から3週間観察した。

30

【0333】

実施例15：ヒトEBC-1腫瘍異種移植片モデルにおける、キメラ9006 + 9338抗体混合物の漸増用量のインビボでの有効性

本実施例は、ヒトMET増幅された非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片における9006 + 9338抗体混合物の漸増用量のインビボでの効果を実証する。

【0334】

方法

5×10^6 EBC-1細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。 150mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液(10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.0)またはモノクローナル抗体9006 + 9338の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。9006 + 9338の1:1混合物を、注入用量当たり、50、25、5または1mg/kgの総抗体濃度で投与した。

40

【0335】

50

結果

接種後11日目に、 150 mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを10匹毎の5群に無作為化し、処理を開始した。図16に示すように、ピークル対照処理した動物と比較して、低濃度の $9006 + 9338$ (1 mg/kg)で処理した動物では、腫瘍増殖は影響を受けなかった。 5 mg/kg の $9006 + 9338$ での処理は、後の時点での腫瘍増殖遅延をもたらし、一方で、 25 または 50 mg/kg の $9006 + 9338$ での処理は、同等のレベルの強力な腫瘍増殖阻害と増殖安定化をもたらした。

【0336】

実施例16：ヒトMKN-45腫瘍異種移植片モデルにおける、キメラ $9006 + 9338$ 抗体混合物のインビボでの有効性

10

本実施例は、ヒトMET増幅させた胃癌細胞株MKN-45の異種移植片における $9006 + 9338$ 抗体混合物のインビボでの有効性を実証する。

【0337】

方法

5×10^6 MKN-45細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。 80 mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液 (10 mM クエン酸ナトリウム、 150 mM 塩化ナトリウム、 $\text{pH}6.0$)、モノクローナル抗体 9006 、モノクローナル抗体 9338 、またはモノクローナル抗体 $9006 + 9338$ の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、 50 mg/kg の総抗体濃度で投与した。従って、 9006 処理および 9338 処理動物は、 9006 または 9338 のそれぞれを 50 mg/kg で投与し、一方、 $9006 + 9338$ で処理した動物は、 25 mg/kg の各抗体を含む混合物を投与した。

20

【0338】

結果

接種後10日目に、 80 mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを8匹毎の4群に無作為化し、処理を開始した。図17に示すように、モノクローナル抗体 9006 または 9338 単独により処理した動物では、ピークル対照処理した動物と比較して、腫瘍増殖がわずかに阻害された。対照的に、 $9006 + 9338$ での処理は、処理中の増殖の安定化をもたらした。このモデルにおけるすべての他の処理よりも優れていた。ピークル処理または 9006 単独処理の群の試験は、腫瘍過成長または腫瘍関連潰瘍により処理期間中に終了し、一方、 9338 群および $9006 + 9338$ 群の動物は、処理を完了した。 $9006 + 9338$ 群は処理終了後2週間観察し、この期間のほとんどの間、増殖安定化が保持された。

30

【0339】

実施例17：ヒトSNU5腫瘍異種移植片モデルにおけるキメラ $9006 + 9338$ 抗体混合物のインビボでの有効性

本実施例は、ヒトMET増幅させた胃癌細胞株SNU5の異種移植片における $9006 + 9338$ 抗体混合物のインビボでの有効性を実証する。

40

【0340】

方法

1×10^7 SNU5細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。 165 mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液 (10 mM クエン酸ナトリウム、 150 mM 塩化ナトリウム、 $\text{pH}6.0$)、モノクローナル抗体 9006 、モノクローナル抗体 9338 、またはモノクローナル抗体 $9006 + 9338$ の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、 50 mg/kg の総抗体濃度で投与した。従って、 9006 処理および 9338 処理動物は、

50

9006または9338のそれぞれを50mg/kgで投与し、一方、9006+9338で処理した動物は、25mg/kgの各抗体を含む混合物を投与した。

【0341】

結果

接種後15日目に、 165mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを8匹毎の4群に無作為化し、処理を開始した。図18に示すように、モノクローナル抗体9006または9338単独または9006+9338抗体混合物により処理した動物で、ピークル対照処理した動物と比較して、腫瘍の退縮が観察された。9006または9006+9338での処理は、9338での処理よりも優れており、9006処理群および9006+9338処理群において、処理終了後50日以上、腫瘍の退縮が保持された。

10

【0342】

実施例18：ヒト肝細胞癌の患者由来の異種移植片モデルにおけるキメラ9006+9338抗体混合物のインビボでの有効性

本実施例は、ヒト肝細胞癌(HCC)の患者由来の異種移植片モデル(LI1037)における9006+9338抗体混合物のインビボでの有効性を実証する。

【0343】

方法

モデルLI1037の腫瘍源は、肝臓癌患者の腫瘍に由来し、それをヌードマウスの皮下にて維持した。腫瘍を 3mm^3 断片に刻み、1つの断片を各マウスの片方の前面脇腹に皮下移植した。動物を、腫瘍が平均 220mm^3 の体積に達したときに、処理群に無作為化した。マウスに、ピークル緩衝液(10mMクエン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.0)またはモノクローナル抗体9006+9338の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、50mg/kgの総抗体濃度で投与した。従って、9006処理および9338処理動物は、9006または9338のそれぞれを50mg/kgで投与し、一方、9006+9338で処理した動物は、25mg/kgの各抗体を含む混合物を投与した。

20

【0344】

結果

接種後21日目に、 220mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを4匹毎の2群に無作為化し、処理を開始した。図19に示すように、9006+9338抗体混合物で処理した動物において、ピークル対照で処理した動物と比較して、腫瘍増殖の阻害が観察された。

30

【0345】

実施例19：ヒトEBC-1腫瘍異種移植片モデルにおける、キメラおよびヒト化抗体混合物のインビボでの比較

本実施例では、キメラ9006+9338抗体混合物およびヒト化Hu9006+Hu9338抗体混合物のインビボでの有効性を、ヒトMET増幅させた非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片において比較した。

【0346】

方法

5×10^6 EBC-1細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。細胞接種後20日目に、 $\sim 130\text{mm}^3$ の平均腫瘍サイズで、マウスを10匹毎の3群に無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液、キメラ9006+9338の1:1混合物、またはヒト化の9006+9338(Hu9006+Hu9338)の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、50mg/kgの総抗体濃度で投与した。従って、9006+9338およびHu9006+Hu9338で処理した動物は、25mg/kgの各抗体を含む混合物を投与された。

40

【0347】

結果

50

図20に示すように、ピークル対照処理動物と比較して、9006 + 9338およびHu9006 + Hu9338で処理した動物の両方において、腫瘍の退縮が観察された。Hu9006 + Hu9338および9006 + 9338の腫瘍阻害効果は、高度に類似していることが明らかとなった。

【0348】

実施例20：ヒトOE33腫瘍異種移植片モデルにおける、キメラおよびヒト化抗体混合物のインビボでの比較

本実施例では、キメラ9006 + 9338抗体混合物およびヒト化Hu9006 + Hu9338抗体混合物のインビボでの有効性を、ヒトMET増幅させた食道胃癌細胞株OE33の異種移植片で比較する。

10

【0349】

方法

OE33腫瘍を、これまでに確立された腫瘍から直列的に移植した。腫瘍は、試験時点で8回継代されていた。~1mm³の腫瘍断片を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下移植した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積をmm³単位で、式：(幅)² × 長さ × 0.5によって計算した。腫瘍接種後30日目に、200mm³の平均腫瘍サイズで、マウスを7匹毎の3群に無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液、キメラ9006 + 9338の1:1混合物、またはヒト化の9006 + 9338 (Hu9006 + Hu9338)の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。全ての抗体処理は、30mg/kgの総抗体濃度で投与した。従って、9006 + 9338およびHu9006 + Hu9338で処理した動物は、15mg/kgの各抗体を含む混合物を投与された。

20

【0350】

結果

図21に示されるように、ピークル対照処理動物と比較して、9006 + 9338およびHu9006 + Hu9338で処理した動物の両方において、腫瘍の退縮が観察され、増殖曲線は高度に類似していた。

【0351】

実施例21：ヒト腫瘍異種移植片モデルにおける、モノクローナル抗体C8-H241およびHu9006 + Hu9338抗体混合物のインビボでの比較

30

本実施例では、Hu9006 + Hu9338抗体混合物および比較としてのモノクローナル抗体C8-H241(表4参照)のインビボでの有効性を、ヒトMET増幅させた非小細胞肺癌細胞株EBC-1およびヒトMET増幅させた胃癌細胞株Hs746T(METのエクソン14の欠失を有する)において比較する。

【0352】

方法

5 × 10⁶ EBC-1細胞または3.7 × 10⁶ Hs746T細胞を、雌の無胸腺マウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積をmm³単位で、式：(幅)² × 長さ × 0.5によって計算した。EBC-1について140mm³の平均腫瘍サイズおよびHs746Tについて120mm³の平均腫瘍サイズで、マウスを無作為化し、処理を開始した。

40

【0353】

EBC-1に対する処理スケジュール：マウスに、ピークル緩衝液、モノクローナル抗体C8-H241、またはモノクローナル抗体Hu9006 + Hu9338の1:1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。観察の21日後に、C8-H241群の残りのマウスに、腫瘍細胞接種後の139日の試験終了まで、週に3回、Hu9006 + Hu9338を用いて再処理した。

【0354】

Hs746Tに対する処理スケジュール：マウスに、ピークル緩衝液、モノクローナル抗体C8-H241、モノクローナル抗体Hu9006、モノクローナル抗体Hu933

50

8またはモノクローナル抗体Hu9006 + Hu9338の1 : 1混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行った。1週間の観察後、Hu9006、Hu9338およびC8 - H241群の全ての残りのマウスに、Hu9006 + Hu9338の単回投与による処理を行い、9日間観察した。

【0355】

全ての抗体処理は、50 mg / kgの総抗体濃度で投与した。従って、C8 - H241、Hu9006およびHu9338で処理した動物は、50 mg / kgの抗体を投与した、一方、Hu9006 + Hu9338で処理した動物は、25 mg / kgの各抗体を含む混合物を投与した。

【0356】

結果

EB C - 1 : 接種後15日目に、140 mm³の平均腫瘍サイズで、マウスを10匹毎の3群に無作為化し、処理を開始した。図22に示されるように、ピークル対照処理動物と比較して、C8 - H241で処理したマウスにおいて、限定された応答が観察された。対照的に、Hu9006 + Hu9338での処理は、腫瘍の退縮を誘導した。最後の投与の21日後に、500 mm³の平均腫瘍体積で、C8 - H241処理群の残りのマウスに、Hu9006 + Hu9338での再処理を行った。図22はまた、該マウスが二次処理に応じて腫瘍の退縮を有したことを示す。

【0357】

Hs746T : 接種後35日目に、120 mm³の平均腫瘍サイズで、マウスを8匹毎の5群に無作為化し、処理を開始した。図23に示されるように、ピークル対照処理動物と比較して、C8 - H241、Hu9006またはHu9338で処理したマウスにおいて、限定された初期阻害応答が観察されたが、処理期間のほぼ中間で、腫瘍が再成長を始めた。対照的に、Hu9006 + Hu9338での処理は、8匹すべての処理マウスで、腫瘍の退縮と完全な腫瘍の根絶を誘導した。最後の投与の9日後に、C8 - H241、Hu9006およびHu9338処理群中の残りのマウスに、Hu9006 + Hu9338の単回投与での再処理をした。図23はまた、該マウスが二次処理に応じて腫瘍の退縮を有したことを示す。

【0358】

実施例22 : 4名のヒト患者由来の異種移植片モデルにおける、モノクローナル抗体C8 - H241およびHu9006 + Hu9338抗体混合物のインビボでの比較

本実施例では、Hu9006 + Hu9338抗体混合物および比較物モノクローナル抗体C8 - H241(表4参照)のインビボでの有効性を、4名のヒトMETを増幅させた非小細胞肺癌(NSCLC)患者由来の異種移植片モデルにおいて比較した。

【0359】

方法

各マウスを、腫瘍形成(development)のためのモデルLXFA0526、LU0858、LU1901またはLU2503(直径2 - 3 mm)からの原発性NSCLC組織断片を脇腹に皮下接種した。腫瘍を、二次元でノギスにより週に2回測定し、腫瘍体積(mm³)を、式:(幅)² × 長さ × 0.5によって計算した。

【0360】

平均腫瘍サイズが100 ~ 200 mm³に達したときに、マウスを3群に無作為化し(1群当たり、n = 5から8匹のマウス)、処理を開始した。マウスに、C8 - H241モノクローナル抗体、Hu9006 + Hu9338抗体混合物(等しい割合で混合した単一のモノクローナル抗体)またはピークル緩衝液対照のいずれかを、腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、3週間まで観察した。

【0361】

全ての抗体処理は、50 mg / kgの総抗体濃度で投与した。従って、C8 - H241で処理した動物は、50 mg / kgの抗体を投与され、一方、Hu9006 + Hu9338で処理した動物は、25 mg / kgの各抗体を含む混合物を投与された。

10

20

30

40

50

【0362】

結果

図24に示すように、4つのモデルにおいてC8-H241処理時の異なる応答が観察された。対照的に、Hu9006+Hu9338での処理は、4つすべてのモデルにおいて、C8-H241処理と比較して、優れた有効性および/または進行の遅延と共に腫瘍の退縮を誘導した。C8-H241は、別のMET増幅させた初代MET増幅による異種移植片NSCLCモデル(LXFA-1647)において顕著に有効であることが既に報告されている(Liu et al. Clin Cancer Res. 20:6059-6070 (2014))。

【0363】

実施例23：ヒト腫瘍異種移植片モデルにおけるHu9006+Hu9338抗体混合物の等しい比およびスキュー比(skewed ratio)の組成物のインビボでの比較

本実施例において、の2つの抗体Hu9006およびHu9338の異なる比率からなる混合物インビボでの有効性を、ヒトMET増幅させた非小細胞肺癌細胞株EBC-1の異種移植片において比較した。

【0364】

方法

5×10^6 EBC-1細胞を、8-9週齢の雌無胸腺ヌードマウスの脇腹に皮下接種した。腫瘍を、週に3回、ノギスにより二次元で測定し、腫瘍体積を mm^3 単位で、式： $(\text{幅})^2 \times \text{長さ} \times 0.5$ によって計算した。細胞接種後13日目に、 150mm^3 の平均腫瘍サイズで、マウスを10匹毎の3群に無作為化し、処理を開始した。マウスに、ピークル緩衝液、1:1、2:1または1:2の抗体比のモノクローナル抗体Hu9006+Hu9338混合物の腹腔内注射による計10回の処理を週に3回行い、その後、観察した。抗体処理は、以下の通り、 50mg/kg で投与するか、または、スキュー比の抗体混合物について、 10mg/kg の総抗体濃度で投与された。1:1比で処理された動物は、 25mg/kg の各抗体を含む混合物を投与された。1:2比で処理された動物は、 10mg/kg の総投与について 3mg/kg のHu9006および 7mg/kg のHu9338を含む混合物を投与されるか、または 50mg/kg の総投与について 17mg/kg のHu9006および 33mg/kg のHu9338を含む混合物を投与された。同様に、2:1比で処理された動物は、 10mg/kg の総投与について 7mg/kg のHu9006および 3mg/kg のHu9338を含む混合物を投与されるか、または 50mg/kg の総投与について 33mg/kg のHu9006および 17mg/kg のHu9338を含む混合物を投与された。

【0365】

結果

図25に示す通り、等しい比およびスキュー比のいずれのHu9006+Hu9338の処理も、いずれの用量の処理も、腫瘍の退縮を誘導した。腫瘍の退縮レベルは、全ての試験した抗体処理で類似しており、等しい比およびスキュー比のいずれの単一の抗体組成物でも腫瘍の増殖阻害をもたらすことを示している。

【0366】

10

20

30

40

【表 1 1】

表 1 1 : 配列番号チャート

配列番号	配列
1	ヒト MET アイソフォーム1 アミノ酸配列
2	ヒト MET アイソフォーム2 アミノ酸配列
3	ニワトリ MET アミノ酸配列
4	マウス MET アミノ酸配列
5	キメラ 9006 重鎖可変ドメイン核酸配列
6	キメラ 9006 重鎖可変ドメインアミノ酸配列
7	キメラ 9006 軽鎖可変ドメイン核酸配列
8	キメラ 9006 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
9	キメラ 9338 重鎖可変ドメイン核酸配列
10	キメラ 9338 重鎖可変ドメインアミノ酸配列
11	キメラ 9338 軽鎖可変ドメイン核酸配列
12	キメラ 9338 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
13	ヒト化 9006 重鎖可変ドメイン核酸配列
14	ヒト化 9006 重鎖可変ドメインアミノ酸配列
15	ヒト化 9006 軽鎖可変ドメイン核酸配列
16	ヒト化 9006 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
17	ヒト化 9338 重鎖可変ドメイン核酸配列
18	ヒト化 9338 重鎖可変ドメインアミノ酸配列
19	ヒト化 9338 軽鎖可変ドメイン核酸配列
20	ヒト化 9338 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
21	9006 重鎖CDR1 アミノ酸配列
22	9006 重鎖CDR2 アミノ酸配列
23	9006 重鎖CDR3 アミノ酸配列
24	9006 軽鎖CDR1 アミノ酸配列
25	9006 軽鎖CDR2 アミノ酸配列
26	9006 軽鎖CDR3 アミノ酸配列
27	9338 重鎖CDR1 アミノ酸配列
28	9338 重鎖CDR2 アミノ酸配列
29	9338 重鎖CDR3 アミノ酸配列
30	9338 軽鎖CDR1 アミノ酸配列
31	9338 軽鎖CDR2 アミノ酸配列
32	9338 軽鎖CDR3 アミノ酸配列
33	ヒト化 9006 軽鎖アミノ酸配列
34	ヒト化 9006 重鎖アミノ酸配列
35	ヒト化 9338 軽鎖アミノ酸配列
36	ヒト化 9338 重鎖アミノ酸配列

10

20

30

40

【 0 3 6 7 】

配列表

配列番号 : 1 (ヒト MET アイソフォーム1 アミノ酸配列) :

MKAPAVLAPG I LVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETP I QNV I LHEHH I FLGATNY I YVLNEEDLQK
VAEYKTPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKDN I NMALVVDTYDDQL I SCGSVNRGTCQRHVFPNHNTAD I QSEVHC
I FSPQ I EEPQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRF I NFFVGNT I NSSFDPHPLHS I SVRRLKETKDGFMFLTDQSY I DVLPE
FRDSYP I KYVHAFESNNF I YFLTQRETLDQAQTFHTR I IRFCS I NSGLHSYMEMPLEC I LTEKRKKRSTKKEVFN I LQAA

50

YVSKPGAQLARQ I GASLNDD I LFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFP I KYVNDFFNK I VNKNVNRCLQHFYGNHEHCFNR
 TLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQQRVDLFGMQFSEVLLTS I STF I KGDLT I ANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFL
 LDHSPVSPEV I VEHTLNQNGYTLV I TGKK I TK I PLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLESGTWTQQ I
 CLPA I YKVFPSNAPLEGGTRLT I CGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMNTLKTCTVGPAMNKHFNMS I I I
 SNGHGTTQYSTFSYVDPV I TS I SPKYGPMAGGTLTLTGNYNLNSGNSRH I S I GGKTCTLKSVSNS I LECYTPAQT I STEF
 AVKLIK I DLANRETS I FSYREDP I VYE I HPTKSF I SGGST I TGVGKNLNSVSVPRMV I NVHEAGRFTVACQHRNSSE I I C
 CTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDG I LSKYFDL I YVHNPVFKPFKEKPVMI SMGNENVLE I KGND I DPEAVKGEVLKVGNK
 SCEN I HLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELN I EWKQA I SSTVLGKV I VQPDQNF TGL I AGVVS I STALLLLGGFFLWLKRRKQ
 I KDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSP I LTSGDS
 DI SSPLLQNTVH I DLSALNPELVQAVQHVV I GPSSL I VHFNEV I GRGHFGCVYHGTLLDNDGKK I HCAVKSLNR I TD I GE
 VSQFLTEG I I MKDFSHPNVLSLLG I CLRSEGSPLVLPYMKHGDRLNF I RNETHNPTVKDL I GFGLQVAKGMKYLASKKF
 VHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRG
 APPYPDVNTFD I TVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSR I SA I FSTF I GEHYVHV NATYVNVK
 CVAPYPSLLSSEDNADDEVTRPASFWETS

10

配列番号：2 (ヒト MET アイソフォーム2 アミノ酸配列) :

MKAPAVLAPG I LVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETP I QNV I LHEHH I FLGATNY I YVLNEEDLQK
 VAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSGGVWKDN I NMALVVDTYDDQL I SCGSVNRGTCQRHVFPNHNTAD I QSEVHC
 I FSPQ I EEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRF I NFFVGNT I NSSYFPDHLHS I SVRRLKETKDGFMFLTDQSY I DVLP
 FRDSYP I KYVHAFESNNF I YFLTVQRETLDQAFTFHR I I RFCS I NSGLHSYMEMPLEC I LTEKRKRSTKKEVFN I LQAA
 YVSKPGAQLARQ I GASLNDD I LFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFP I KYVNDFFNK I VNKNVNRCLQHFYGNHEHCFNR
 TLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQQRVDLFGMQFSEVLLTS I STF I KGDLT I ANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFL
 LDHSPVSPEV I VEHTLNQNGYTLV I TGKK I TK I PLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLESGTWTQQ I
 CLPA I YKVFPSNAPLEGGTRLT I CGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMNTLKTCTVGPAMNKHFNMS I I I
 SNGHGTTQYSTFSYVDPV I TS I SPKYGPMAGGTLTLTGNYNLNSGNSRH I S I GGKTCTLKSVSNS I LECYTPAQT I STEF
 AVKLIK I DLANRETS I FSYREDP I VYE I HPTKSF I STWWKEPLN I VSFLFCFASGGST I TGVGKNLNSVSVPRMV I NVHEA
 GRNFTVACQHRNSSE I I CCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDG I LSKYFDL I YVHNPVFKPFKEKPVMI SMGNENVLE I KG
 ND I DPEAVKGEVLKVGNKSCEN I HLHSEAVLCTVPNDLLKLNSELN I EWKQA I SSTVLGKV I VQPDQNF TGL I AGVVS I S
 TALLLLGGFFLWLKRRKQ I KDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCR
 QVQYPLTDMSP I LTSGDS I SSPLLQNTVH I DLSALNPELVQAVQHVV I GPSSL I VHFNEV I GRGHFGCVYHGTLLDNDG
 KK I HCAVKSLNR I TD I GEVSQFLTEG I I MKDFSHPNVLSLLG I CLRSEGSPLVLPYMKHGDRLNF I RNETHNPTVKDL I
 GFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTT
 KSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFD I TVYLLQGRLLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSR I SA I FS
 TF I GEHYVHV NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVTRPASFWETS

20

30

配列番号：3 (ニワトリ MET アミノ酸配列) :

MKPVTAYPSG I I LFLFALLQRSHGQCKEAAKSEMNLNVKYDLPNF I TETP I QNVVLYKHHVY I GAVNK I YVLNETLQN I
 SVYKTGP I LESPGCAPCEDCKDKANLSNSVWKDNVNMALLETYDDQL I SCGSVSGGVCHRHI I PPDNPAD I ESEVHCM
 YSPQVDGEADNCPDCVSTLGTGLVTEKDRFVNFFVGNTMTSAFQPPHVLHS I SVRRLKETQDGFELTDQSY I D I LPQ
 FRDSYP I KYVHAFEHDFVYFLTVQRESLDSQTFHR I I RFCTLDSEMRSYMEMPLEC I FTEKRKRKRS I RKEVFN I LQAA
 YVSKPGAALAHMGLGL I DD I LYGVFAQTNQ I PQEPTNRSVCAVSVRT I NEFFNK I VDKQNMKCLQHFYGKDSKYCLNR
 AFSRNASYCRAQDDEYRLEVTTPLQQRVDLFGMQFNN I LLTS I SVFTKGNLT I ANLGTSEGRFMQ I VVSRSEPTAPHVSFQ
 LDHSHAVSPQVVVEQSAADGYTLVVTGKK I TKVPLNGPGCHHFQSCSQCLLAPAFMRCGWCGQQCLRAPECNGGTWTQET
 CLPRVYE I LPSSAPLEGGTKLTLGWDGFGFSKNNRFELRNTVVH I GGQ I CALEAKSSNKNKLECTAPAAKNASFN I SSSV
 SVGHGKTLFNTFSYVNP I I TS I SPTYGPKSGGTLT I AGKYNLNSGKSRR I FVGEKPCSLKSTSESSVECYTPAQR I PQEY
 RVRVG I DGA I RDAKGYFTYREDPVVLK I HPAKSFLSGGST I TAQG I NLNSVCFPRMV I TVPKLGMNFSVACSHRSSSE I I
 CCTTPSLKAFNLQPPFVTKVFF I FDGVSSLYDFDYVNNPVFKHFKEKPV I SRSNPNVLE I KGNH I DSEAVKGEVLKVG
 NKSCENLLLQSET I LCTVPSDLLKSNSELN I EWKQEV LSTV I GKVL I RQDQNF TGL I AGVVSTSVL I Y I FLVFFLWRRKKK
 Q I KDLGSDLVRYDGRVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSSSEVDYRSTFLEDQFPSSMSQNGSCRPAQYPHSDLSP I LSSGD
 SDLASPLLQNTVH I D I SALNPDLVKEVQHVV I GADSLMVHFSEV I GRGHFGCVSHGTLLDNDGRK I HCAVKSLNR I TDLE
 EVAQFLKEG I I MKDFTHPNVLSLLG I CLPNEGSPVLPYMKHGDRLNF I RNETHNPTVKDL I GFGLQVAKGMKYLASKK
 FVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG LARDVYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTR

40

50

GAPPYPDVNSFDITVYLLQGRRLQLQPEYCPDPLYEVMLKCWHPKPEMRPAFSELVSKI STIFSTFIDGEHYVHVNATYVNV
KCVAPYPSLLSSQDNTDMDVDT

【 0 3 6 8 】

配列番号：4 (マウス MET アミノ酸配列) :

MKAPTVLAPGILVLLLSLVQRSHGECKEALVKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQNVVLHGHHIYLGATNYIYVLNDKDLQK
VSEFKTGPVLEHPDCLPCRDCSSKANSSGGVWKDNI NMALLVDITYDDQLISCGSVNRGTQQRHVLPPDNSADIQSEVHC
MFSPEEESGQPCDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPPGYSLHSISVRRLLKETQDGFKFLTDQSYIDVLP
QDSYPIKYIHAFESNHFIFLTVQKETLDAQTFHTRIRFCVSDSGLHSEMPLECI LTEKRRKRSTREEVFNILQAA
VSKPGANLAKQIGASPSDDILFGVFAQSKPDSAEPVNRSAVCAFP IKYVNDFFNKIVNKNVRLQHFYGPNEHC
FNRTLLRNSSGCEARSDEYRTEFTTALQRVDLFGRLNQVLLTISSTFIKGLDITANLGTSEGRFMQVVL
SRTAHLTPHVNFLLD SHPVSPEVIVEHPSNQNGYTLVVTGKKITKIPNLGLGCGHFQSCSQCLSAPYFIQCGW
CHNQCVRFDECPSGTWTQEICLPVAVYKVFPTSAPLEGGTVLTICGWDFGFRKNNKFDLRKTKVLLGNE
SCTLTLESTTNTLKCTVGPAMSEHFNVSVIISNSRETTQYSAFSYVDPVITSISPRYGPQAGGTL
LTGKYLNSGNSRHISISGGKTCTLKSVSISILECYTPAQTTSDEFPVKLKIDLANRETSSFSYREDPVV
YIEHPTKSFISGGSTITGITKTLNSVSLPKLVIDVHEVGVNYTVACQHRNSNEIICCTTPSLKQLGLQL
PLKTKAFFLLDGLSKHFDLTYVHNPFVPEFEPKPMISIGNENVVEIKGNNIDPEAVKGEVLKVG
NQSCESLHWHSGAVLCTVPSDLLKLNSELNIEWKQAVSSTVLGKVI VQPDQNFAGLIGAVSISVVVLLS
GLFVWLRKRKHKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGACRQV
QYPLTDLSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYH
GTLLDNDGKKIHCAVKSLNRTDIEEVSQFLTEGIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVLPYMKHGD
LRNFRNETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFG
LARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESQTQKFTTKSDVWSFGVLLWELMTRGAP
PYPDVNTFDITIVYLLQGRRLQLQPEYCPDALYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISSTIFSTFIDGE
HYVHVNATYVNVKCVAPYPSLLPSQDNIDGEGNT

10
20

配列番号：5 (キメラ 9006 重鎖可変ドメイン核酸配列) :

CAGATCCATTTGGGGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTA
TACCTTCACAAACTTTAGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCT
ACACTGGAGAGCCAACATATGTTGATGACTTGAAGGGACGTTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTAT
TTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACATATTTCTGTGCAAGGAAAGGGATTGCGAGGGCTATGGACTA
CTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCGAGT

配列番号：6 (キメラ 9006 重鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

QIHLGQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFRMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFAFSLETSASTAY
LQINNLKNEDMATYFCARKGIARAMDYWGQTSVTVSS

30

配列番号：7 (キメラ 9006 軽鎖可変ドメイン核酸配列) :

AACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGAGTGTGTGACAGGAGAGATGGTCACTATGAGTTGTAAGTCCAGTCA
GAGTCTGTTAGACAGTGGAAATCAAAAAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTCAACTTTTGA
TCTTCGGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACCGATTTCACTCTTACC
GTCAGCAGTGTGACAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATCATAGTTATCCGTACACGTTCCGAGGGGG
GACCAAGCTGGAAATAAAA

【 0 3 6 9 】

配列番号：8 (キメラ 9006 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

NI VMTQSPSSLSVSAGEMVTMSCKSSQSLLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPQLLIFGASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT
VSSVQAEDLAVYYCQNDHSYPYTFGGGTKLEIK

40

配列番号：9 (キメラ 9338 重鎖可変ドメイン核酸配列) :

CAGGTCCAACGCAACAGCCTGGGGCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAGGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTA
CACCTTTACTAGTTACTGGATGCACTGGGTAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTA
GCAGTGGTCATATTGAGAACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAACTGAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGACGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG
GACTCTGGTCACTGTCTCGAGT

配列番号：10 (キメラ 9338 重鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

QVQLQQPGAELAKPGASVRMSCKASGYTFTSYWMHWKQRPQGGLWIGYINPSSGHIENNQKFKDKATLTADKSSSTAY
MQLSSLTFEDSAVYYCARGRFAYWGQGLVTVSS

50

配列番号：11 (キメラ 9338 軽鎖可変ドメイン核酸配列) :

GATATTGTGATGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCTTGACCTGCAGTGCCAGCTC
AAGTGTAAGTTCCGGCTACTTGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCA
ACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAGTCAACAGCATGGAG
GCTGAAGATGCTGCCTCTTATTTCTGCCATCAGTGGAGTAGTTACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAGCT
GAAA

配列番号：12 (キメラ 9338 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

DIVMTQSPA IMSASPGKVTLSASSSVSSGYLYWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTVNSME
AEDAASYFCHQWSSYPFTFGSGTKLELK

配列番号：13 (ヒト化 9006 重鎖可変ドメイン核酸配列) :

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGATCCGAGCTGAAGAACTGGCGCCTCCGTGAAGGTGCTCTGCAAGGCTTCCGGCTA
CACCTTTACCAACTTCCGGATGAACTGGGTCAAGCAGGCCCCAGGCCAGGGCCTGAAATGGATGGGCTGGATCAACACCT
ACACCGCGAGCCACCTACGTGGACGACCTGAAGGGCAGATTCTGTCTCCCTGGACACCTCCGTGTCCACCGCCTAC
CTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGAAGGAATCGCCAGAGCCATGGATTA
TTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACAGTCTCGAGT

配列番号：14 (ヒト化 9006 重鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYFTFNFRMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYVDDLKGRFVFLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQTTVTVSS

【0370】

配列番号：15 (ヒト化 9006 軽鎖可変ドメイン核酸配列) :

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCTCTGGCCGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCCA
GTCCCTGCTGGACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGA
TCTTTGGCGCCTCCACCCGGGAATCTGGCGTGCCGATAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTTTACCTGACC
ATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGAACGACCACTCCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGG
CACCAAGCTGGAAATCAAG

配列番号：16 (ヒト化 9006 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPPLKIFGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
LSSSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGQGTKLEIK

配列番号：17 (ヒト化 9338 重鎖可変ドメイン核酸配列) :

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTGAAGAAACCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGCTCTGCAAGGCTCCTCCGGCTA
CACCTTTACCAGTACTGGATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCTACATCAACCCCT
CCAGCGCCACATCGAGAACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCTCCACCGCCTAC
ATGGAAGTGTCTCCCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGATTGCGCTACTGGGGCCAGGG
CACCTCGTGACAGTCTCGAGT

配列番号：18 (ヒト化 9338 重鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQTLVTVSS

配列番号：19 (ヒト化 9338 軽鎖可変ドメイン核酸配列) :

GAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCTGCCACCCTGTCTCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCTACCCTGTCTGCTCCGCCTCCTC
CTCTGTGCTCCTCCGGCTACCTGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTACTCTACCTCCA
ACCTGGCCTCCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCTCCAGCTGGAA
CCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCACCAGTGGTCCAGCTACCCCTTACCTTTGGCTCCGGCACCAAGCTGAAAT
CAAG

配列番号：20 (ヒト化 9338 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列) :

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSVSSGYLYWYQQKPGQAPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSE
PEDFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIK

配列番号：21 (9006 重鎖CDR1 アミノ酸配列) :

GYTFTNFR

配列番号：22 (9006 重鎖CDR2 アミノ酸配列) :

INTYTGEP

10

20

30

40

50

配列番号：23 (9006 重鎖CDR3 アミノ酸配列) :
ARKGIARAMDY

配列番号：24 (9006 軽鎖CDR1 アミノ酸配列) :
QSLLDSGNQKNY

配列番号：25 (9006 軽鎖CDR2 アミノ酸配列) :
GAS

配列番号：26 (9006 軽鎖CDR3 アミノ酸配列) :
QNDHSYPYT

配列番号：27 (9338 重鎖CDR1 アミノ酸配列) :
GYTFTSYW

10

【 0 3 7 1 】

配列番号：28 (9338 重鎖CDR2 アミノ酸配列) :
INPSSGHI

配列番号：29 (9338 重鎖CDR3 アミノ酸配列) :
ARGRFAY

配列番号：30 (9338 軽鎖CDR1 アミノ酸配列) :
SSVSSGY

配列番号：31 (9338 軽鎖CDR2 アミノ酸配列) :
STS

配列番号：32 (9338 軽鎖CDR3 アミノ酸配列) :
HQWSSYPFT

20

配列番号：33 (ヒト化 9006 軽鎖アミノ酸配列) :

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLDSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQAEDVAVYYCQNDHSYPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号：34 (ヒト化 9006 重鎖アミノ酸配列) :

QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYFTFTNFRMNWVKAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYVDDLKGRFVFLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTAVYYCARKGIARAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

配列番号：35 (ヒト化 9338 軽鎖アミノ酸配列) :

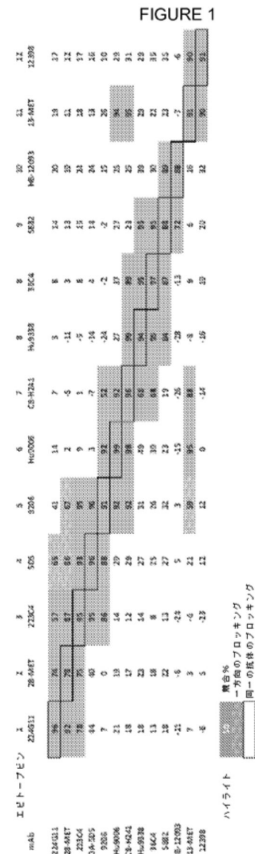
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSGGLYWYQQKPGQAPRLIYSTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE
PEDFAVYYCHQWSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号：36 (ヒト化 9338 重鎖アミノ酸配列) :

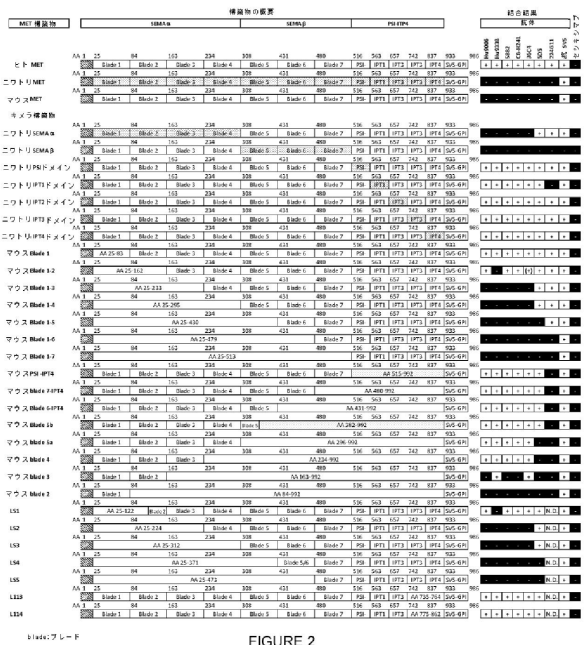
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGHIENNQKFKDRVTITADKSTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

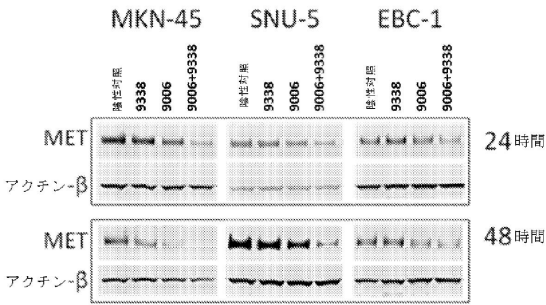
【 図 1 】



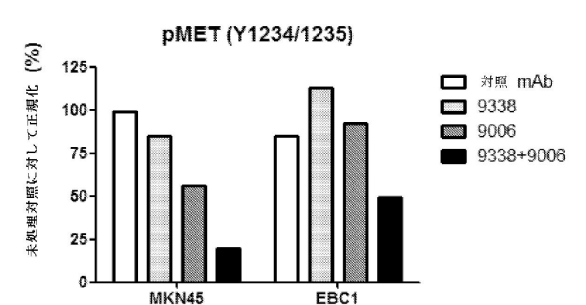
【 図 2 】



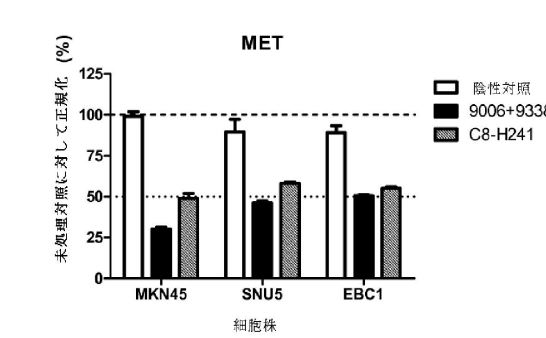
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



B

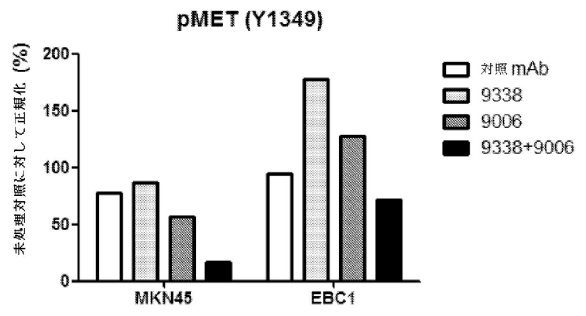


FIGURE 4

FIGURE 5

【 図 6 】

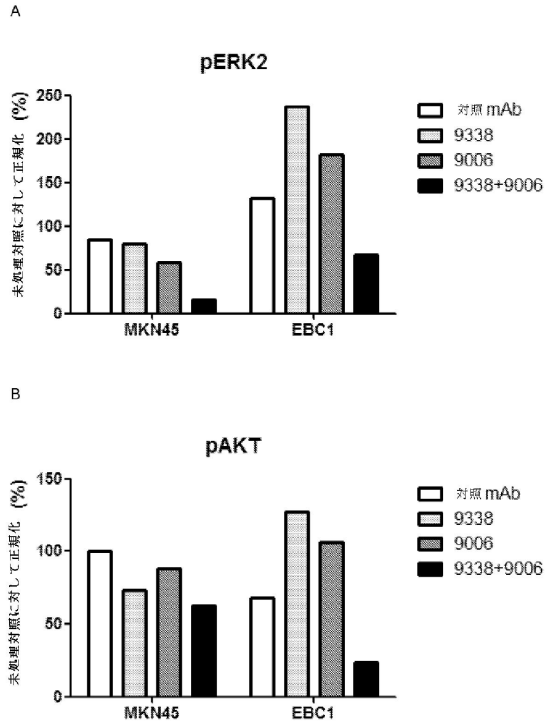


FIGURE 6

【 図 7 】

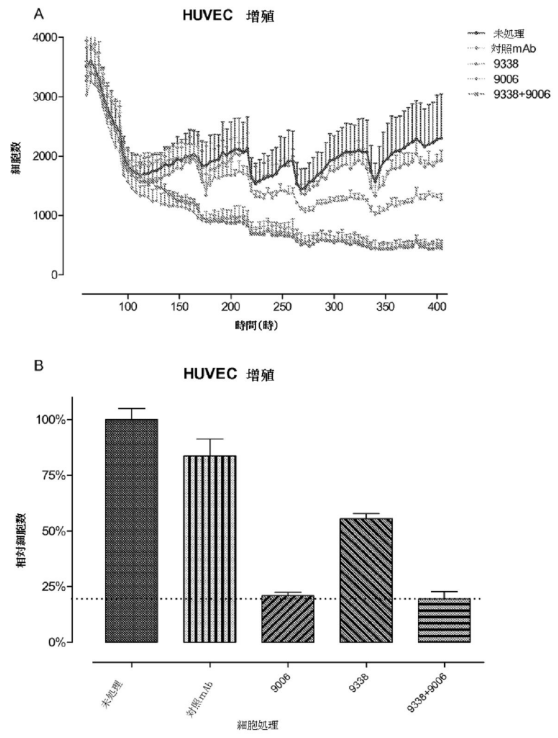


FIGURE 7

【 図 8 】

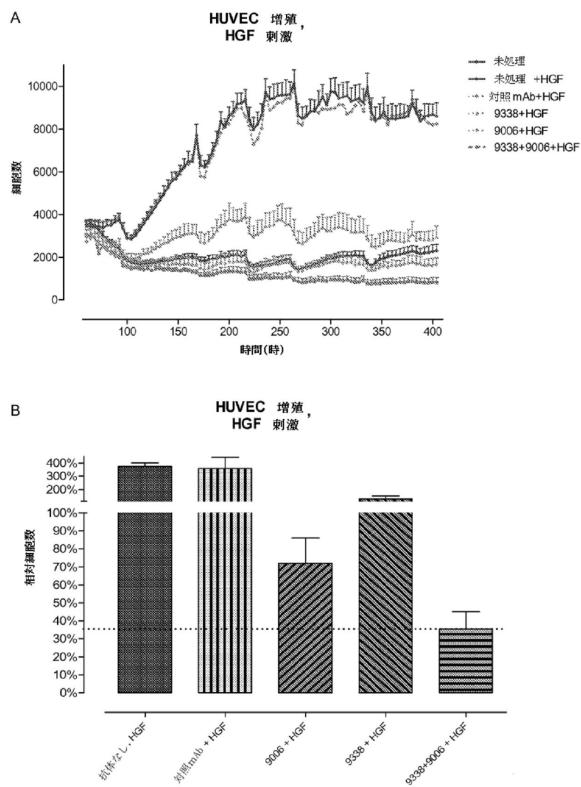


FIGURE 8

【 図 9 】

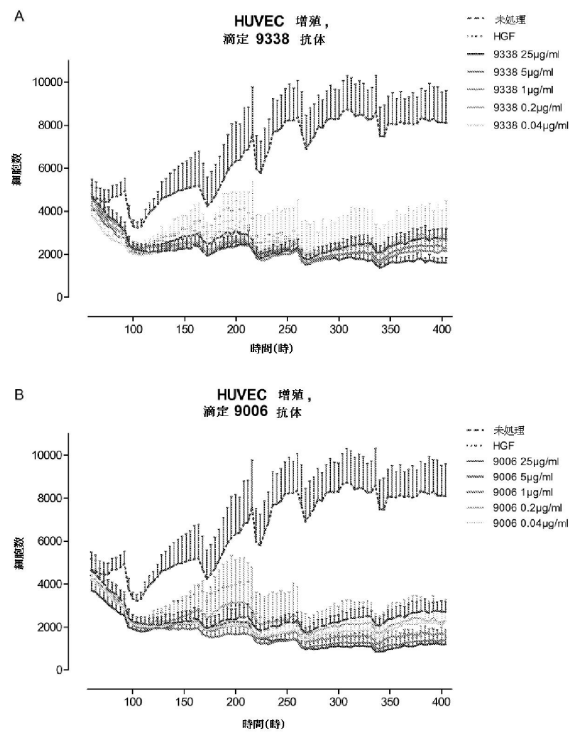


FIGURE 9

【 図 1 0 】

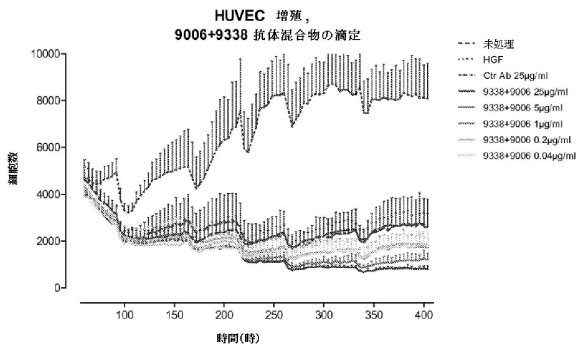


FIGURE 10

【 図 1 1 】

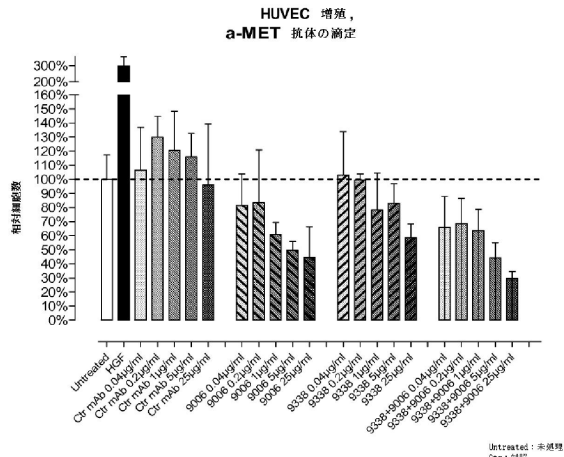


FIGURE 11

【 図 1 2 】

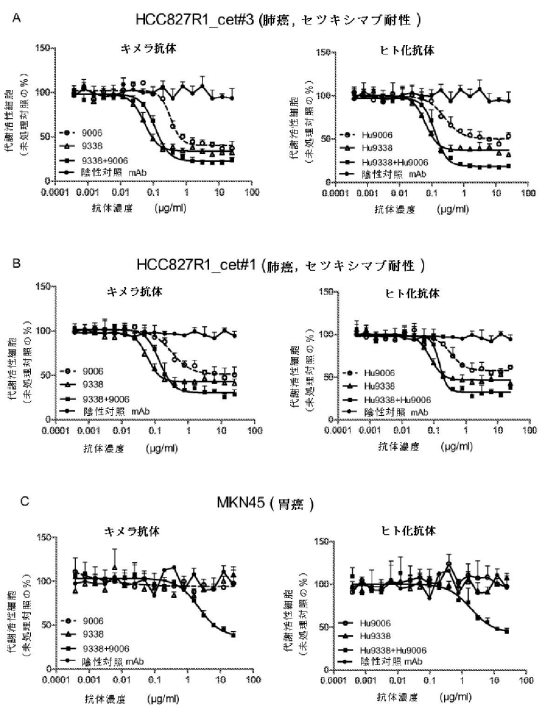


FIGURE 12

【 図 1 3 】

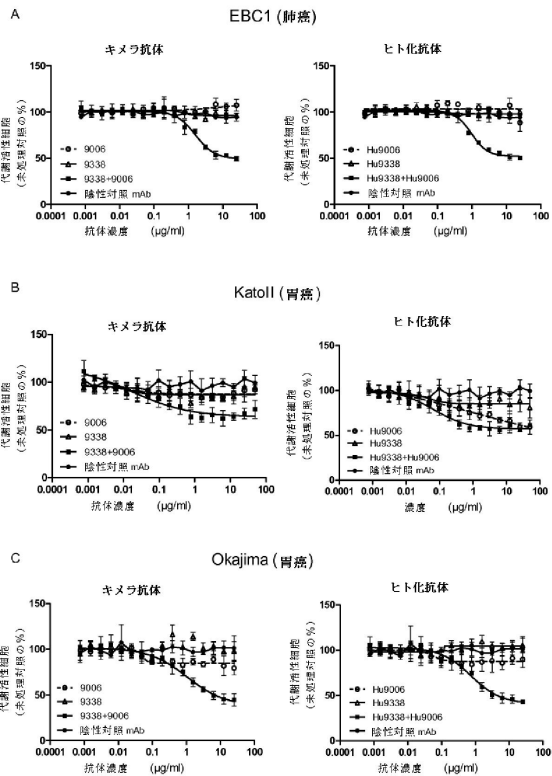


FIGURE 13

【 図 1 4 】

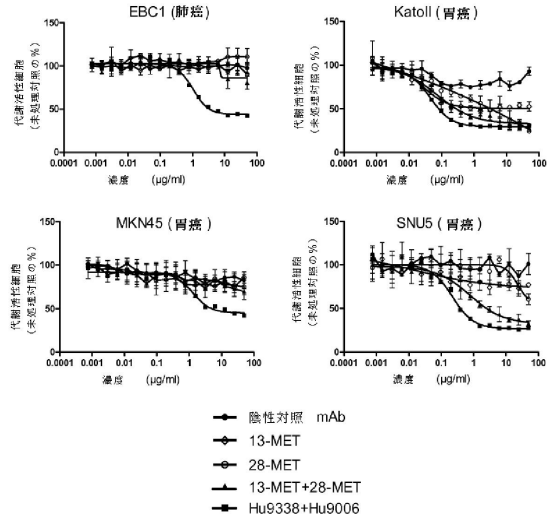


FIGURE 14

【 図 1 5 】

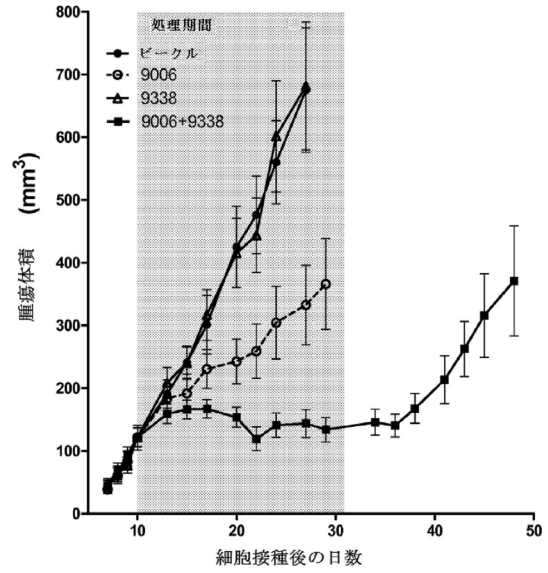


FIGURE 15

【 図 1 6 】

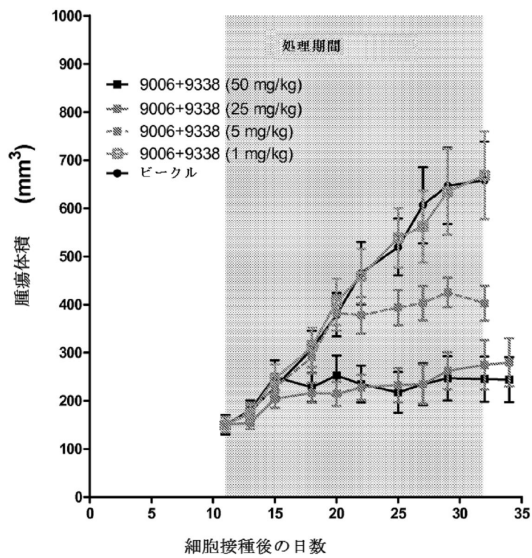


FIGURE 16

【 図 1 7 】

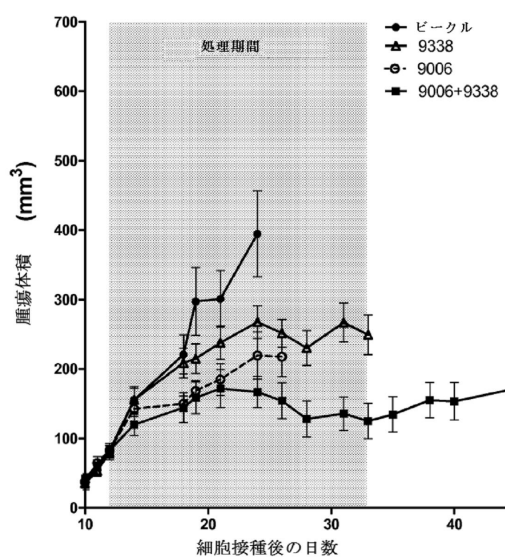


FIGURE 17

【 図 18 】

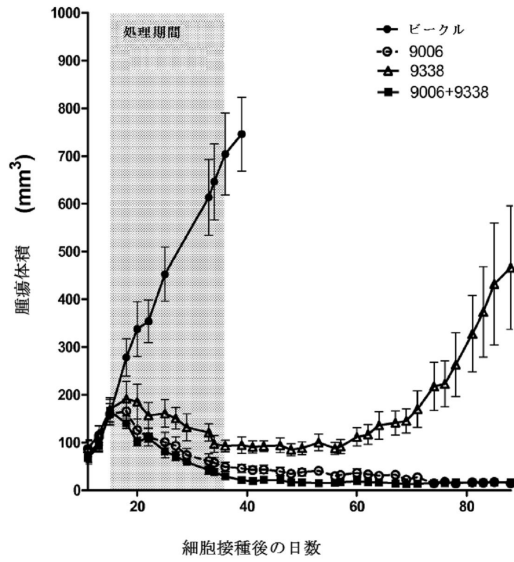


FIGURE 18

【 図 19 】

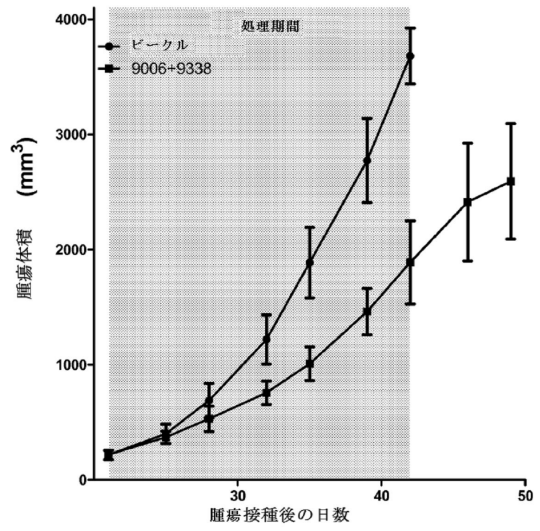


FIGURE 19

【 図 20 】

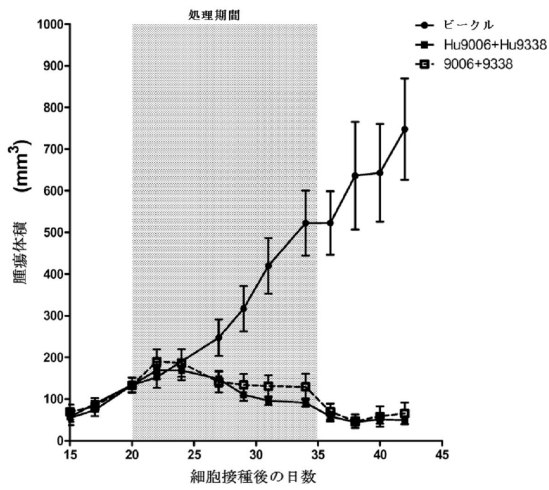


FIGURE 20

【 図 21 】

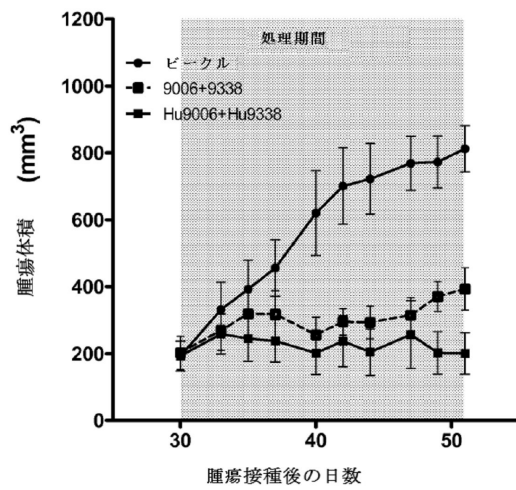


FIGURE 21

【 図 2 2 】

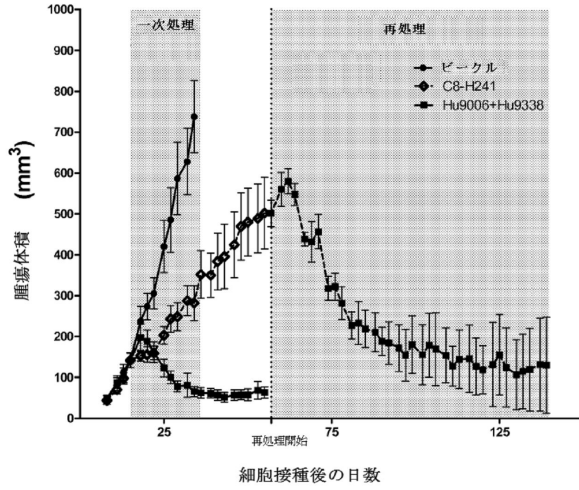


FIGURE 22

【 図 2 3 】

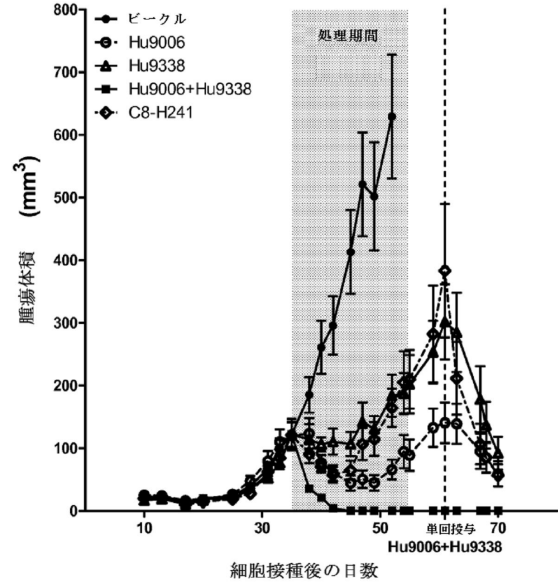


FIGURE 23

【 図 2 4 】

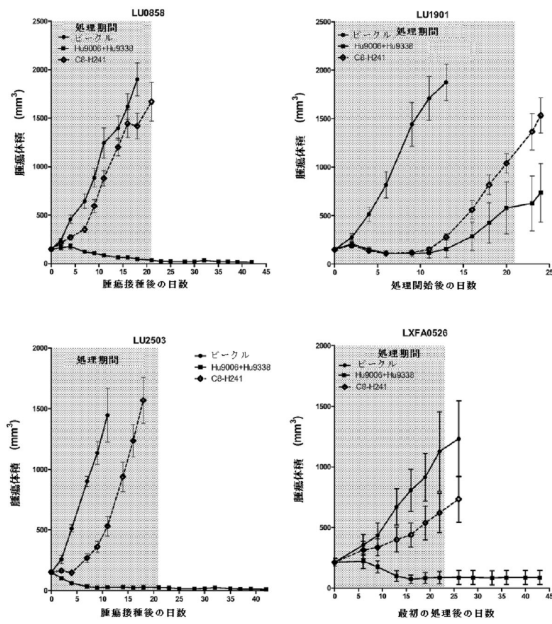


FIGURE 24

【 図 2 5 】

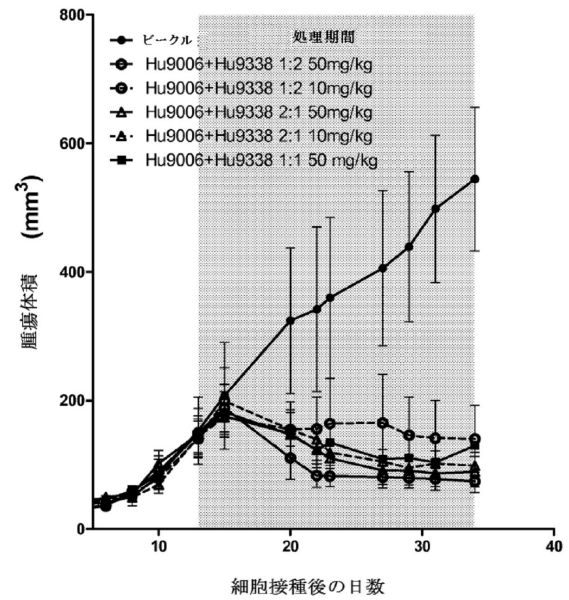


FIGURE 25

【 3 0 】

HU 9006 LC
 01VWFDP3SLAVSLGRKATLICKKSDLSLSDSDRWKLANVCKYKQDPDPALLIFDQVIREAVYDPVRFSDGSDPTFLLSLQDAENAVNYLQDINWYVYFDOSTKLEINRTAAP*
 VFIIPPSDQGLASDSTARVCLLINTYFREAKYQWVDVALDSNSDESVEFDQRSTYELSLTLLSNADYKHKYVACEVTHQDLESPTKSFRRGEC

HU 9006 HC
 QVQLVQDGEELKPKGKAAKVCCHAASTFTTTRMMNKVKALEQDQLKMMKRTYDQSTFVDDLVGDFVFEIQTSGSTAYLQISLQAEEDTAVYVCGKQVLAANDVWGDSYLVYSSAS
 TQGPSVFIAPSSKSTGGTAAALGLWDYFPEPVTYSNNGALTSQVYFPAVLOSGLYELSSVYFSSLSGDTYICVNNKPKTKVDKRVKPKCKTKPCFQPAPELLGQPS
 VFLFPPKPDITLMSRPFDELCSYVEVSEKPEKRWNYGVSEVNAKTKRREDQSTINWYSKLVLDKRWKNGKLVCKYKNAKLPAPERTISKAGDQPEPQVYLPSSREEDT
 KINQVSLTCLVWGFYPSDIAYEWSNGQFENYKTFPVLDDGDFLYKLVDSRWQDQVFCSEVNHKALINNYTKLSLSPG

HU 9038 LC
 EIVLTDSPATLSLSPGEKALISCAASISSEGLNVDYGVVGDGDPALLIYSQSLASGIANFSGSDGSDPTFLLSLQDAENAVNYLQDINWYVYFDOSTKLEINRTAAPSYFIP
 PRDQLKSGTARVCLLINTYFREAKYQWVDVALDSNSDESVEFDQRSTYELSLTLLSNADYKHKYVACEVTHQDLESPTKSFRRGEC

HU 9038 HC
 QVQLVQDGEELKPKGKAAKVCCHAASTFTTTRMMNKVKALEQDQLKMMKRTYDQSTFVDDLVGDFVFEIQTSGSTAYLQISLQAEEDTAVYVCGKQVLAANDVWGDSYLVYSSAS
 SYFPLAPSSKSTGGTAAALGLWDYFPEPVTYSNNGALTSQVYFPAVLOSGLYELSSVYFSSLSGDTYICVNNKPKTKVDKRVKPKCKTKPCFQPAPELLGQPSVFLF
 PPKPDITLMSRPFDELCSYVEVSEKPEKRWNYGVSEVNAKTKRREDQSTINWYSKLVLDKRWKNGKLVCKYKNAKLPAPERTISKAGDQPEPQVYLPSSREEDT
 SLTCLVGYTFSDIAYEWSNGQFENYKTFPVLDDGDFLYKLVDSRWQDQVFCSEVNHKALINNYTKLSLSPG

【 配列表 】

000692787500001.app

【 3 1 】

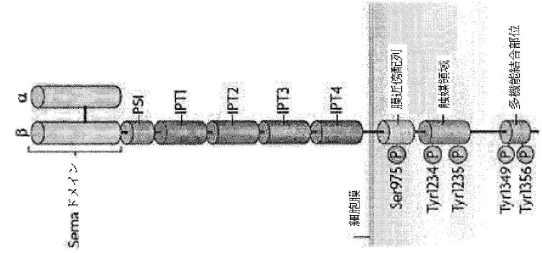


FIGURE 30

FIGURE 31

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 0 1 K	67/02 (2006.01)	A 0 1 K	67/02
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00 A

- (72)発明者 トーマス・ボーキン
デンマーク、デーコー - 3 4 5 0 アレレス、キルケルテヴァイ 4 4 番
- (72)発明者 ミッケル・ヴァンダール・ペダーセン
デンマーク、デーコー - 3 4 5 0 アレレス、フォレルヴァイ 1 7 番
- (72)発明者 ヘレ・イエーネ・ヤコブセン
デンマーク、デーコー - 2 8 3 0 ヴィールム、フルクタイネット 6 6 番
- (72)発明者 トーマス・トゥクセン・ポウルセン
デンマーク、デーコー - 2 8 7 0 ディセゴー、プレズレヴァイ 1 2 番
- (72)発明者 ミカエル・モンラズ・グランダル
デンマーク、デーコー - 2 7 5 0 バレルブ、ソルプリンケン 2 6 アー番
- (72)発明者 クラウス・コフォーズ
デンマーク、デーコー - 1 5 6 1 コペンハーゲン・ダブリュー、ハウホルメン 2 4 番、1 チル・ヴェンストレ
- (72)発明者 ミカエル・クラウ
デンマーク、デーコー - 2 2 0 0 コペンハーゲン・エン、レーソエースギャーゼ 1 アー番、5 チル・ヴェンストレ
- (72)発明者 カーステン・ヴェッセル・エリクセン
デンマーク、デーコー - 3 0 6 0 エスパゲア、トフテヴァイ 7 ベー番
- (72)発明者 パオロ・コンロット
デンマーク、デーコー - 2 6 6 0 プレンビュー・ストランド、ベッケルンデン 1 3 9 番

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 4 5 7 3 8 (J P , A)
国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 2 7 3 8 (W O , A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 0 9 8 8 1 (J P , A)
Neoplasia , 2 0 0 9 年 , 11 卷 4 号 , pp. 355-364.

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 0 7 K 1 6 / 2 8
C 1 2 N 1 5 / 1 3
C 1 2 P 2 1 / 0 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q